

Rebut: 29 de setembre de 2016
Acceptat: 28 d'octubre de 2016

RESISTÈNCIA A LA INSULINA I FUNCIONS COGNITIVES: EL PAPER DE LA FRUCTOSA

Castilla, Clàudia;¹ Alegret, Marta

Departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Terapèutica.
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació.
Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII 27-31 08028 Barcelona

Abstract

Recent studies suggest that excessive consumption of fructose is involved in alterations at the level of the cortex and/or hippocampus, areas that are responsible for language comprehension, memory and learning. In this paper, we study the effect of supplementation with 10% (w/v) glucose or fructose in drinking water for seven months on insulin signalling pathways in the cortex and the emergence of cognitive disorders in female rats. The results show that while glucose provides the same amount of calories, only the rats supplemented with fructose showed a reduction in the levels of key proteins in the insulin signalling pathway in the cortex and in the levels of the neurogenic protein BDNF, along with cognitive alterations observed in the novel object recognition test. Therefore, we conclude that these changes occur due to additional mechanisms to caloric excess.

Keywords: fructose, sweetened drinks, cognitive disorders, insulin

Resumen

Estudios recientes sugieren que el consumo excesivo de fructosa está involucrado en alteraciones a nivel de córtex y/o hipocampo, áreas responsables de la comprensión del lenguaje, la memoria y el aprendizaje. En el presente trabajo se estudia el efecto de la suplementación con fructosa o glucosa al 10% (p/v) en el agua de bebida durante 7 meses en las vías de señalización de la insulina en córtex y la aparición de alteraciones cognitivas en ratas hembra. Los resultados muestran que, aunque la glucosa aporta la misma cantidad de calorías, solo las ratas suplementadas con fructosa presentan una reducción en los niveles de proteínas clave en la vía de señalización de la insulina en córtex y en los niveles de la proteína neurogénica BDNF, junto con una alteración cognitiva observada en la prueba de reconocimiento de objetos nuevos. Por lo tanto, se puede concluir que dichas alteraciones se producen debido a mecanismos adicionales en exceso calórico.

Palabras clave: fructosa, bebidas edulcoradas, alteraciones cognitivas, insulina.

Resum

Estudis recents suggereixen que el consum excessiu de fructosa està involucrat en alteracions a nivell de còrtex i/o hipocamp, àrees que són responsables de la comprensió del llenguatge, la memòria i l'aprenentatge. En el present treball s'estudia l'efecte de la suplementació amb fructosa o glucosa al 10% (p/v) en l'aigua de beguda durant set mesos sobre les vies de senyalització de la insulina en còrtex i l'aparició d'alteracions cognitives en rates femella. Els resultats mostren que, tot i que la glucosa aporta la mateixa quantitat de calories, només les rates suplementades amb fructosa presenten una reducció en els nivells de proteïnes clau en la via de senyalització de la insulina en còrtex i en els nivells de la proteïna neurogènica BDNF, juntament amb una alteració cognitiva observada en la prova de reconeixement d'objectes nous. Per tant, es pot concloure que les esmentades alteracions es produeixen a causa de mecanismes addicionals a l'excés calòric.

Paraules clau: fructosa, begudes edulcorades, alteracions cognitives, insulina.

¹ Graduada en farmàcia (claudiacastillab@gmail.com)

1. Introducció

La fructosa o levulosa és un dels dos monosacàrids més comuns en la natura. Es troba en fruites, mel, verdures i en unió a la molècula de glucosa, formant així la sacarosa, el sucre de taula comú. Tot i tenir la mateixa fórmula empírica que la glucosa ($C_6H_{12}O_6$), essent isòmers, no coincideixen en el seu metabolisme. En les últimes dècades s'ha observat un notable augment en la prevalença d'obesitat i, consegüentment, de síndrome metabòlica fins a unes alçades preocupants, sobretot en països desenvolupats com els Estats Units i altres països occidentals (Malik *et al.*, 2006). Aquest increment està relacionat amb dietes hipercalòriques i amb la manca d'activitat física, factors clau per entendre l'elevada incidència de les malalties metabòliques que a continuació s'exposen. Però no només es tracta de l'augment en el consum de calories, sinó també dels canvis en els tipus de nutrients ingerits. Un dels canvis alarmants és el consum excessiu de productes amb sucres afegits, essent com és la fructosa un dels sucres més destacables. S'ingereix mitjançant begudes edulcorades, menjars prefabricats i pastisseria industrial i, com indicava, aquest elevat consum sembla estar relacionat amb malalties com l'obesitat, la dislipidèmia, el fetge gras, la diabetis mellitus tipus 2 i amb alteracions cognitives, entre d'altres (Bray *et al.*, 2004; Gross *et al.*, 2004; Welsh *et al.*, 2011).

A mesura que avancem en edat, la proliferació de les cèl·lules disminueix, fet que provoca una disminució del desenvolupament de les neurones i que afecta la memòria espacial. És per això que se sospita de factors externs, com la dieta, com a responsables d'aquesta distorsió. Un cop més, no es tracta només del fet que la dieta sigui hipercalòrica, sinó del consum excessiu de determinats components que en formen part, amb especial atenció, en el meu cas, a la fructosa (Van der Borgh *et al.*, 2011).

Tot i que actualment els estudis existents en aquest aspecte són molt primerencs, hi ha algunes evidències que indiquen que rates alimentades amb dieta a base de fructosa presenten alteracions en la memòria (Stranahan *et al.*, 2009; Stephan *et al.*, 2010; Lakhan i Kirchgessner, 2013). La resistència a la insulina és un dels mecanismes que sembla jugar un paper molt important en les alteracions cognitives (Jurdak i Kanarek, 2009; White *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2014), i acostuma a implicar alteracions en els mediadors intracel·lulars d'aquesta hormona. El receptor de la insulina (IR) és una glucoproteïna amb activitat tirosina cinasa que, en ser estimulat pel seu lligand, s'autofosforila en els residus tirosina. L'autofosforilació inicia una cascada de senyalització mitjançant la via de les quinases activades per mitogens (MAPK) i la via de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). La transducció de senyals de la via PI3K s'inicia quan el receptor IR es troba autofosforilat i fosforila la proteïna *insulin receptor substrate* (IRS). La proteïna IRS presenta quatre isoformes, entre les quals, les més importants en la regulació del metabolisme de la glucosa són IRS-1 i IRS-2. Les IRS fosforilades en posició tirosina s'associen a la cinasa PI3K i l'activen, amb la qual cosa provoquen la fosforilació de la proteïna quinasa B (Pkb, també anomenada AKT). L'AKT fosforilada activa la fosforilació d'altres substrats (GSK-3 β , FoxO1, etc.) i dóna lloc als efectes fisiològics de la insulina.

D'altra banda, les alteracions cognitives es relacionen també amb una reducció en els nivells de diverses proteïnes neuronals, com per exemple el *brain-derived neurotrophic factor* o BDNF (Agrawal i Gómez-Pinilla, 2012). La BDNF és una proteïna produïda per les neurones i la seva activitat està directament relacionada amb la neuronal: col·labora en la plasticitat neuronal i contribueix als diferents mecanismes cel·lulars i moleculars relatius a la formació i la funció sinàptica, així com al creixement neuronal i

dendrític. S'ha observat que els nivells cerebrals de BDNF solen ser directament proporcionals al rendiment cognitiu dels animals d'experimentació (Stranahan *et al.*, 2009; Mattson, 2010).

La hipòtesi del present treball és que la suplementació crònica (set mesos) amb fructosa líquida 10% (p/v) en rates femella altera la regulació del metabolisme —resistència a la insulina— i els processos cognitius —memòria i aprenentatge— a causa de mecanismes diferents de l'excés calòric i, per tant, propis de la fructosa i no d'altres sucres com la glucosa. Per tal de verificar aquesta hipòtesi, s'han utilitzat rates Sprague-Dawley femella, la dieta de les quals ha estat suplementada amb fructosa o glucosa 10% (p/v) en l'aigua de beguda durant set mesos i s'ha determinat si aquests suplementes han produït alteracions metabòliques i cognitives, i si es poden relacionar amb alteracions de la via de senyalització de la insulina en còrtex.

2. Materials i mètodes

2.1. Disseny de l'estudi i obtenció de mostres

Per a aquest treball s'han utilitzat 36 rates femella Sprague-Dawley (Harlan Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, Barcelona) que s'han mantingut amb dieta (pinso Harlan 2014) i beguda *ad libitum*, condicions d'humitat i temperatura constants i un cicle de dotze hores de llum/fosc dia/nit durant set mesos. Les 36 rates van ser dividides aleatòriament en tres grups de tractament de 12 rates cadascun: control, alimentades amb una dieta estàndard, sense cap suplement en la beguda; fructosa, alimentades amb una dieta estàndard complementada amb fructosa 10% (p/v) en l'aigua de beguda, i glucosa, alimentades amb una dieta estàndard complementada amb glucosa 10% (p/v) en l'aigua de beguda, aportant-los les mateixes calories que el suplement de fructosa.

Durant els set mesos que va durar l'estudi es va controlar la ingesta de dieta sòlida consumida setmanalment, i de beguda ingerida tres cops per setmana, per cada gàbia (contenint dues rates). També es va mesurar el pes de tots els animals un cop cada dues setmanes. Just abans de finalitzar els set mesos de tractament, es va procedir a realitzar el test de tolerància a la glucosa a tots els animals després de sis hores en dejú i les proves cognitives corresponents.

Finalitzat el tractament, els animals es van deixar en dejú 12 hores i es van anestesiar amb una solució de ketamina (Imalgene de Merial): xilazina (Rompun® de Bayer) (90:10 mg/kg pes). Es van obtenir mostres de sang a partir d'una incisió a la cua per tal de determinar els nivells plasmàtics de triglicèrids mitjançant tires reactives i el glucòmetre Accutrend® Plus de Roche.

De les dotze rates de cada grup, quatre es van sacrificar per decapitació i es van destinar en exclusiva a la perfusió de l'encèfal per a posteriors assaigs d'immunohistoquímica (no realitzats en el present treball). Les vuit restants es van sacrificar per exsanguinació per a l'obtenció de mostres de plasma i cervell.

Tot l'estudi es va desenvolupar segons les pautes del Comitè de Bioètica de la Universitat de Barcelona, descrit en la Llei 5/1995 del 21 juliol de la Generalitat de Catalunya.

2.2. Test de novel object recognition

El test de Novel Object Recognition es basa en la preferència que presenten les rates per explorar objectes nous respecte a d'altres que ja coneixen. Per dur a terme aquest test, es mesura i es compara el temps que cada rata dedica a explorar cada objecte —proximitat, olfacte o tacte físic (Antunes i Biala, 2012).

L'estudi es va desenvolupar amb una caixa de dimensions 30 × 70 × 70 cm que es neteja amb una solució d'etanol abans de fer entrar l'animal. El test, que va tenir una duració de quatre dies, consta de tres parts: l'habitució, la familiarització i el test pròpiament dit a dos temps.

L'habitució es va desenvolupar el primer i el segon dia. Es va posar l'animal dins de la caixa durant deu minuts, sense la presència de cap objecte, fent així que l'animal s'habitues a l'entorn. La familiarització es va desenvolupar el tercer dia. Es van col·locar simètricament dos objectes idèntics i amb l'espai suficient per permetre a l'animal l'accés lliure i es va introduir l'animal dins la caixa, entre els dos objectes, permetent-li l'exploració durant deu minuts. El test a dues hores, tal com indica, es va desenvolupar just dues hores després de la familiarització de les rates. L'objectiu és estudiar la memòria a curt termini. Es va substituir un dels objectes de la fase de familiarització per un objecte diferent. A continuació, es va introduir la rata dins la caixa, entre els dos objectes, i com amb anterioritat es va registrar la seva reacció i el temps d'exploració davant la situació d'objecte desconegut. El test a 24 hores es va desenvolupar just 24 hores després de la familiarització de les rates. En aquest cas, l'objectiu és l'estudi de la memòria a llarg termini. Es va substituir un dels objectes de la fase de familiarització per un de diferent a aquest i al presentat en el test de dues hores, que resultaria desconegut per a l'animal que recordés els objectes del dia anterior. De la mateixa manera, es permet l'exploració durant 10 minuts i es registra la reacció dels animals.

2.3. Test de tolerància a la glucosa (ttg) i determinació dels nivells d'insulina

Una setmana abans del sacrifici es va realitzar el TTG. Les rates es van deixar en dejú 6 hores i, a continuació, se'ls va administrar una solució de 0,4 g de glucosa anhidra (Sigma) / mL de sèrum (0,9% NaCl de Sigma) per via intraperitoneal (IP) (2g/kg de pes de rata). Es van utilitzar agulles 25 G (BD Microlance TM 3) i xeringues d'1 mL (BD PlastipakTM). En els temps 0, 15, 30, 60, 90 i 120 minuts es van obtenir mostres de sang a partir d'una petita incisió a la cua i es va determinar la concentració de glucosa en sang amb tires reactives i amb el glucòmetre Accutrend® Plus de Roche.

A fi i efecte d'estudiar la variació dels nivells d'insulina postadministració del bol IP de glucosa, es van prendre mostres de sang a temps 0, 15 i 120 minuts, a partir de les quals es va preparar plasma. Posteriorment, es van determinar els nivells d'insulina en aquestes mostres per la tècnica ELISA (Enzymed-Linked Immuno Sorbent Assay).

2.4. Tècnica de western blot

Per preparar els extractes de proteïna total es va homogeneïtzar la mostra de teixit (còrtex) amb la de tampó de lisi mitjançant un homogeneïtzador tissular elèctric (Polytron® PT 10-35) durant vint segons. La composició del tampó de lisi és la següent: Tris-HCl pH

7.5 20 mM; NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 100 mM, Igepal® 1% (v/v), pirofosfat sòdic (NaPPi) 2 mM, fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, leupeptina 2 µg/mL, ortovanadat sòdic (Na₃VO₄) 1 mM, aprotinina 2.5 µg/mL. Posteriorment, l'homogenat es va sotmetre a incubació dues hores a 4° C en un agitador orbital. A continuació es va centrifugar durant quinze minuts a 15.000 x g a la mateixa temperatura i es va recuperar el sobrenedant. La concentració de proteïna en l'extracte es va determinar seguint el mètode de Bradford.

Extractes de proteïna total (30 µg) es van sotmetre a electroforesi en gel de poliacrilamida 10%. Les proteïnes es van transferir a membranes de PVDF (Millipore, Bedford, MA) i les membranes es van bloquejar una hora a temperatura ambient en TBS-T 0,1% (Tris Buffered Salí amb Tween® 20). Posteriorment, es va procedir a incubar les membranes amb l'anticòs primari corresponent, durant tota la nit en tampó TBS-T a 4° C i agitació suau, i després amb l'anticòs secundari, durant 1 hora a temperatura ambient i agitació suau. La detecció es va realitzar amb el sistema de quimioluminescència ECL. Les membranes es van incubar també amb un anticòs contra la β-actina, utilitzada com a control per assegurar la càrrega de la mateixa quantitat de proteïna entre les diferents mostres. La mida de les proteïnes detectades es va estimar utilitzant estàndards de pes molecular.

2.5. Mètode de bradford

Per a la determinació de la concentració de proteïna es va utilitzar el mètode de Bradford (Bradford, 1976) adaptat a la lectura en microplaca. Es tracta d'un mètode colorimètric basat en el fet que l'absorbància màxima de la solució àcida Coomassie Blue G-250 canvia de 465 a 595 nm quan té lloc la unió a la proteïna en qüestió, moment en què la coloració marronosa vira a un to blavós. La concentració de proteïna es determina per interpolació en una recta de calibrat preparada amb albúmina sèrica bovina (BSA, Sigma) com a patró (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 µg/µL).

En cada pou de la microplaca es van disposar 10 µL de la solució patró o de la mostra, i s'hi van afegir 190 µL del reactiu de Bradford (Bio-Rad Protein Reagent), prèvia dilució 1/5 amb aigua bidestil·lada. Després de deixar reaccionar els reactius durant 10 minuts, es va determinar l'absorbància a 595 nm amb un espectrofotòmetre de microplaca (Bio-Rad Benchmark Plus).

2.6. Anàlisi estadística

Les dades zoomètriques i de consum s'expressen com la mitjana dels valors o com l'àrea sota la corba (AUC) ± desviació estàndard per a n = 12 mostres per cada grup. Les dades dels nivells de proteïnes en còrtex corresponen a la mitjana dels valors ± desviació estàndard per a n = 4 (control) i n = 5 (glucosa i fructosa) mostres. Els resultats han estat tractats amb el programa GraphPad InStat a través d'una anàlisi estadística mitjançant el test ANOVA, paramètric o no segons correspongui, seguit del test de Bonferroni, per determinar les diferències entre els grups. Les diferències es consideren significatives per p < 0,05.

3. Resultats

3.1. Consum de beguda, dieta sòlida i ingesta calòrica

Al llarg del tractament es va realitzar un seguiment del consum de dieta sòlida i de beguda dels animals. En la figura 1 es mostra la quantitat de beguda consumida pels animals dels tres diferents grups —control, fructosa i glucosa—, expressada com l'àrea sota la corba (AUC). S'observa un increment de 2,6 vegades aproximadament en la quantitat de beguda consumida pel grup suplementat amb la solució 10% (p/v) de glucosa i un increment de 3,1 vegades si fa no fa en la quantitat d'aigua beguda pel grup suplementat amb la solució 10% (p/v) de fructosa. En la figura 2 es mostra la ingesta de la dieta sòlida pels animals dels tres diferents grups, expressada novament com l'àrea sota la corba (AUC). S'observa una disminució de la ingesta en el grup de rates tractades amb glucosa i fructosa.

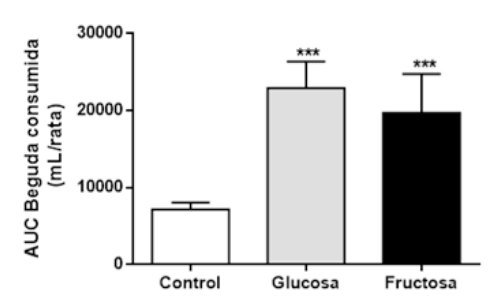


Figura 1. Beguda consumida expressada com l'àrea sota la corba (AUC). Resultats expressats com la mitjana $\pm$ SD per $n = 12$ animals/grup. Anàlisi estadística *one-way* ANOVA i posttest Bonferroni. (***) $P < 0,001$ vs. CT.

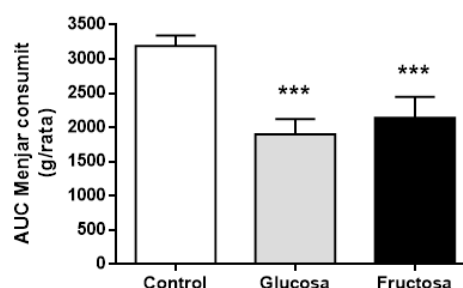


Figura 2. Dieta sòlida consumida expressada com l'àrea sota la corba (AUC). Resultats expressats com la mitjana $\pm$ SD per $n = 12$ animals/grup. Anàlisi estadística *one-way* ANOVA i posttest Bonferroni. (***) $P < 0,001$ vs. CT.

Tenint en compte que la fructosa aporta 4 Kcal/g i la dieta estàndard 3,1 Kcal/g, es pot observar que la reducció d'ingesta de dieta sòlida no ha estat suficient per a compensar l'increment calòric aportat a partir de la ingesta tant de fructosa com de glucosa en solucions del 10% (p/v) cadascuna (figura 3).

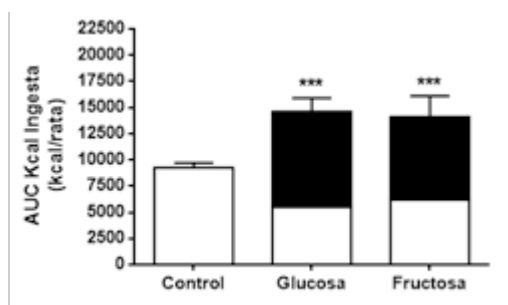


Figura 3. Valors d'ingesta calòrica total, expressada com a AUC Kcal ingerides en set mesos per $n = 12$ animals. Les barres blanques corresponen a Kcal que provenen de la dieta sòlida; les negres, de la beguda. Anàlisi estadística *one-way* ANOVA i posttest Bonferroni. (***) $P < 0,001$ vs. CT.

3.2. Consum de beguda, dieta sòlida i ingesta calòrica

En la figura 4 es mostra el pes corporal dels animals dels tres diferents grups, expressat com AUC. Pot observar-se que havent-hi un augment en la quantitat de beguda, una reducció en

la ingesta de la dieta sòlida i un augment de les quilocalories totals ingerides, el pes corporal s'ha mantingut en el grup de rates suplementades amb la solució 10% (p/v) de glucosa, però ha augmentat 1,1 vegades en el grup que va rebre la solució 10% (p/v) de fructosa.

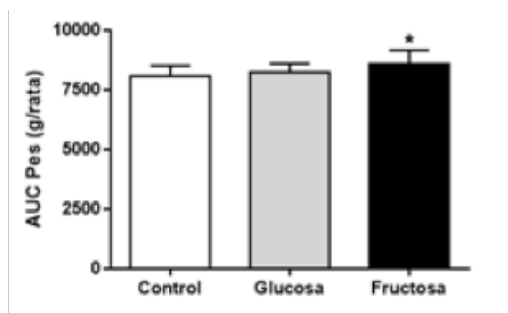


Figura 4. Pes corporal dels animals, expressat com l'àrea sota la corba (AUC). Resultats expressats com la mitjana $\pm$ SD per $n = 12$ animals. Anàlisi estadística *one-way* ANOVA i posttest Bonferroni. (*) $P < 0,05$ vs. CT.

3.3. Paràmetres plasmàtics

A partir de les mostres de plasma obtingudes es van determinar els nivells de glucosa, insulina i triglicèrids. Com s'observa en la figura 5, els nivells de glucosa en sang després de 12 hores en dejú no van mostrar diferències significatives en cap dels grups de tractament. En canvi, la concentració d'insulina en sang es veu augmentada 1,7 vegades aproximadament en el grup fructosa respecte al grup control (figura 6). Pel que fa als nivells plasmàtics de triglicèrids, existeixen diferències respecte al grup control en el grup d'animals tractats amb la solució 10% (p/v) de fructosa. L'augment és d'1,7 vegades, aproximadament (figura 7).

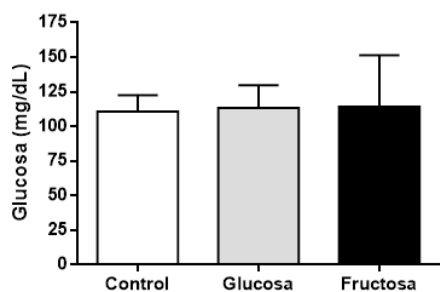


Figura 5. Concentració plasmàtica de glucosa (mg/dL). Resultats expressats com la mitjana $\pm$ SD per $n = 12$ animals. Anàlisi estadística *one-way* ANOVA i posttest Bonferroni.

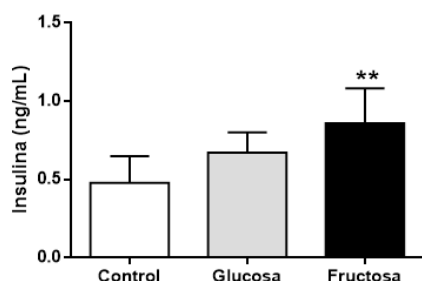


Figura 6. Concentració plasmàtica d'insulina (ng/mL). Resultats expressats com la mitjana $\pm$ SD per $n = 12$ animals. Anàlisi estadística *one-way* ANOVA i posttest Bonferroni. (**) $P < 0,01$ vs. CT.

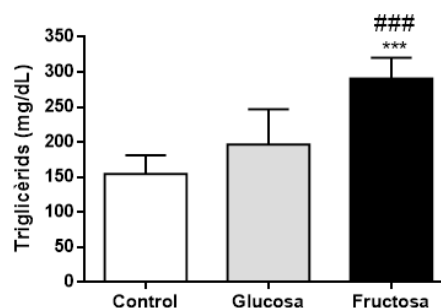


Figura 7. Concentració plasmàtica de triglicèrids (mg/mL). Resultats expressats com la mitjana $\pm$ SD per $n = 12$ animals. Anàlisi estadística *one-way* ANOVA i posttest Bonferroni. (***) $P < 0,001$ vs. CT. (###) $P < 0,001$ vs. GLU.

3.4. Test de tolerància a la glucosa

En acabar el tractament es va realitzar el test de tolerància a la glucosa. Tots els grups van presentar una tendència molt similar, malgrat que en el temps més llarg (120 minuts) el grup fructosa presenta nivells plasmàtics de glucosa significativament més alts (figura 8A). Tot i així, els valors d'AUC no es modifiquen significativament (figura 8B).

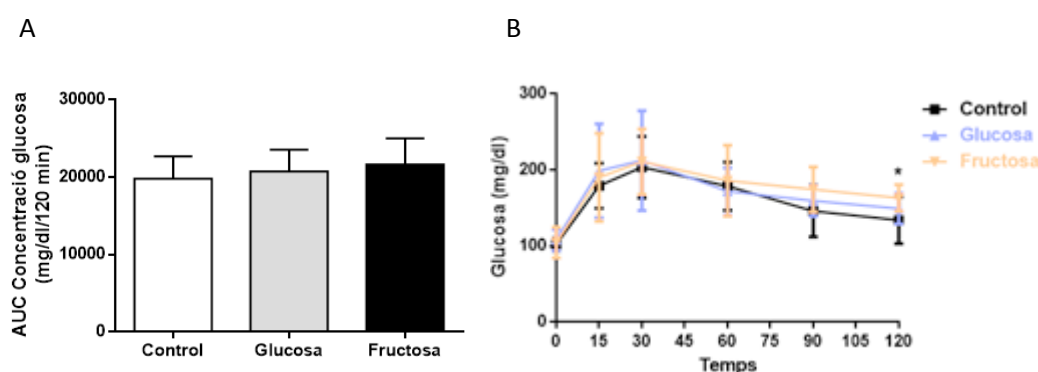


Figura 8. Representació gràfica de l'AUC de la concentració plasmàtica de glucosa al final del TTG (A) i als diferents temps del TTG, expressada en mg/dL (B). Resultats expressats com la mitjana $\pm$ SD per de $n = 9$ rates en el grup control i $n = 12$ rates en els grups glucosa i fructosa. Anàlisi estadística *one-way* ANOVA i posttest Bonferroni. (*) $P < 0,05$ vs. CT.

També es van determinar els nivells d'insulina a temps 0, 15 i 120 minuts després de l'administració IP de glucosa. La concentració plasmàtica a temps 0 minuts és 1,8 vegades aproximadament superior en el grup d'animals tractats amb la solució 10% (p/v) de fructosa respecte als altres dos grups. Al temps 15 minuts, els nivells del grup fructosa es troben per sobre dels del grup control i glucosa, 1,5 i 2,4 vegades aproximadament, respectivament. Al temps 120 minuts no es manifesten diferències estadísticament significatives, però, tot i així, els nivells de fructosa són superiors als dels altres dos grups de tractament (figura 9A). En la figura 9B, l'AUC dels valors plasmàtics d'insulina en finalitzar el TTG es mostren augmentats 1,5 i 2,0 vegades aproximadament en el grup fructosa respecte al grup control i al grup glucosa, respectivament.

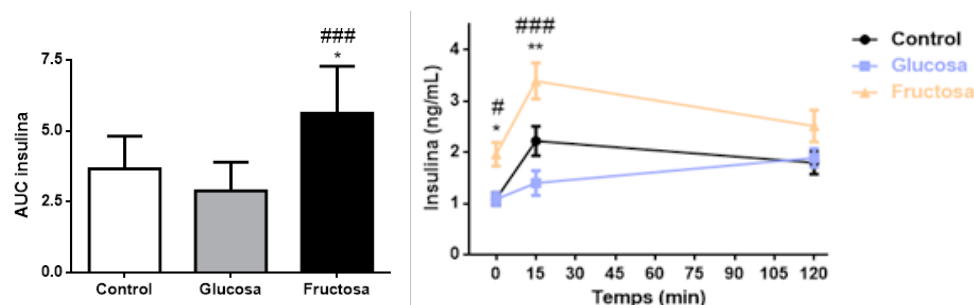


Figura 9. Representació gràfica de l'AUC de la concentració plasmàtica d'insulina al final del TTG (A) i als diferents temps del TTG, expressada en ng/dL (B). Resultats expressats com la mitjana $\pm$ SD per $n = 9$ rates en el grup control i $n = 12$ rates en els grups glucosa i fructosa. Anàlisi estadística *one-way* ANOVA i posttest Bonferroni. (*) $P < 0,05$ vs. CT.

3.5. Novel object recognition

Els resultats de test són una bona eina per a assenyalar científicament, sota estudis experimentals, si hi ha una relació certa entre els danys ocasionats en el cervell a nivell d'hipocamp i còrtex amb l'alteració de la memòria. Els resultats d'aquest test s'expressen com a índex de discriminació (ID), que es calcula segons el temps que els animals passen explorant cada objecte amb la fórmula següent:

$$ID = \frac{\text{temps objecte desconegut} - \text{temps objecte conegut}}{\text{temps objecte desconegut} + \text{temps objecte conegut}}$$

A continuació es mostren els resultats obtinguts en rates després de set mesos de tractament. Al final de l'estudi, en el test realitzat dues hores després de la familiarització, s'aprecia com el grup fructosa manifesta diferències (en la figura 10A), tenint un ID reduït de manera significativa respecte als altres dos grups. De manera molt semblant succeeix 24 hores després de la familiarització: s'observa que el grup fructosa ha obtingut un ID inferior al del grup glucosa (figura 10B).

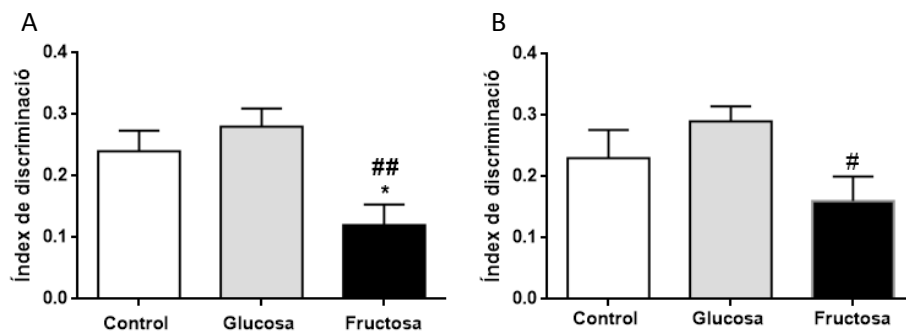


Figura 10. Representació gràfica de l'ID del test a 2 h (A) i a 24h (B) realitzats al final de l'estudi, expressats com la mitjana $\pm$ SD de n = 12 animals en els tres diferents grups. Anàlisi estadística *one-way* ANOVA i posttest Bonferroni. (*) P < 0,05 vs. CT; (#) P < 0,05, i (##) P < 0,01 vs. GLU.

3.6. Determinació de proteïnes en còrtex

Els resultats de les determinacions de proteïnes relacionades amb la senyalització d'insulina en mostres de còrtex cerebral van fer evident la davallada en els nivells d'AKT-P en el grup fructosa, sense que hi hagi modificació en els nivells d'AKT-total. Els nivells d'IRS2 disminueixen en un 42,1% en el grup fructosa, tot i que la disminució no és estadísticament significativa. Pel que fa a proteïnes implicades en la neurogènesi, els nivells de BDNF madur es redueixen un 51% en el grup fructosa i un 33% en el grup glucosa (figura 11).

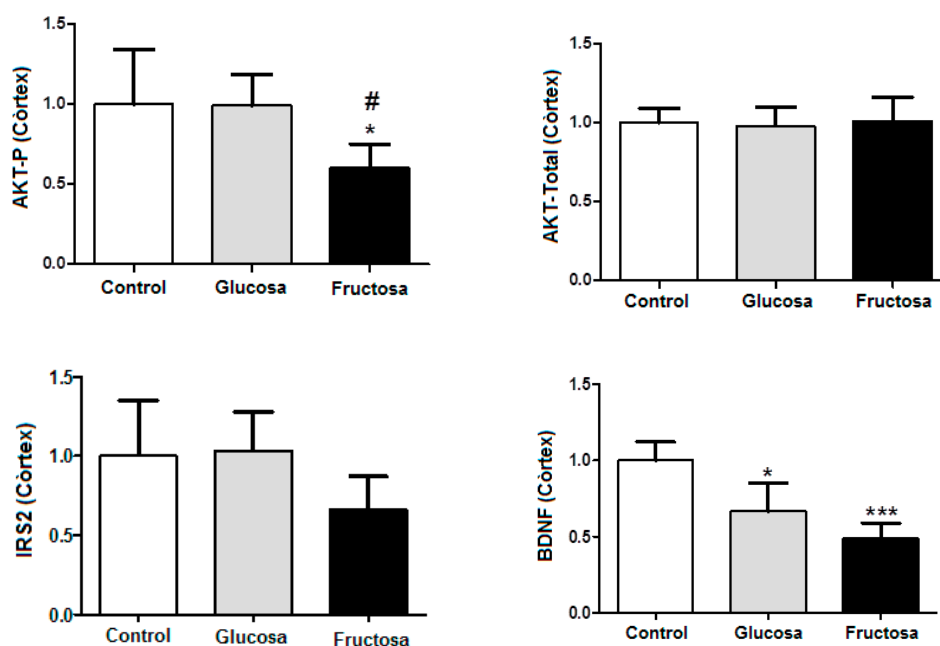


Figura 11. Representació dels nivells de proteïnes AKT-P, AKT-total, IRS2 i BDNF madur. Resultats expressats com la mitjana $\pm$ SD per $n = 4$ rates en el grup control i $n = 5$ rates en els grups glucosa i fructosa. Anàlisi estadística *one-way* ANOVA i posttest Bonferroni. (*) $P < 0,05$, i (***) $P < 0,001$ vs CT, (#) $P < 0,05$ vs GLU.

(*) $P < 0,05$ i (***) $P < 0,001$ vs CT, (#) $P < 0,05$ vs GLU. Anàlisi estadística *one-way* ANOVA i post-test Bonferroni. (*) $P < 0,05$ vs. CT; (#) $P < 0,05$ i (##) $P < 0,01$ vs. GLU.

4. Discussió

Cada vegada més, el nostre estil de vida determina les malalties a les quals ens enfrontem i, consegüentment, cada vegada més, caldran nous estudis per entendre la totalitat d'aquestes malalties i combatre les diferents alteracions del metabolisme. Els estils de vida es veuen molt condicionats per la riquesa del país, que marca la gran diferència entre països subdesenvolupats, on menjar és únicament una necessitat, i països desenvolupats, on menjar és un plaer i fins i tot es menja sense demanda fisiològica. En aquest segon cas és quan prenen importància l'aspecte i les propietats organolèptiques. És per aquest motiu que es produeix un excés de consum d'edulcorants (Tappy i Lê, 2010).

El nostre grup de recerca ha realitzat diferents estudis previs de suplementació de glucosa i fructosa en rates a diferents temps de tractament (14, 28 i 56 dies). Els resultats van mostrar una clara resistència a la insulina, l'esteatosi hepàtica i la hipertrigliceridèmia en rates suplementades amb fructosa (Roglans *et al.*, 2007; Rebollo *et al.*, 2014). Complementant aquests estudis, hem dut a terme el tractament a set mesos, consum crònic, per determinar els efectes metabòlics i cognitius del consum d'aquest sucre. Certament, els resultats obtinguts mostren diferències entre els grups, que es discuteixen a continuació per ordre d'exposició de l'apartat de resultats experimentals.

Els animals suplementats amb glucosa i fructosa han presentat un augment en el consum de beguda respecte al grup control i han reduït el consum de dieta sòlida. És

molt probable que es tracti d'un mecanisme compensatori de l'SNC de l'organisme que, com es pot veure en la bibliografia consultada, pot ser un intent d'equilibrar les calories totals consumides (Rebollo *et al.*, 2014; Bursać *et al.*, 2014). Malgrat això, la compensació no és total i es produeix un increment significatiu en les calories totals ingerides en ambdós grups de carbohidrats respecte al grup control. No hi ha diferència entre les calories totals consumides en els dos grups suplementats amb carbohidrats, de tal manera que qualsevol efecte que pugui presentar-se només en el grup fructosa serà únicament en resposta a mecanismes exclusius d'aquest sucre. Per exemple, el pes corporal només pateix increment en el grup fructosa, fet que indica l'existència d'algun mecanisme adjacent a l'increment de calories ingerides.

En aquest punt cal destacar l'existència de resultats contradictoris quant a aquesta última variable (increment del pes corporal), ja que es veu altament afectada segons la via d'administració del carbohidrat (Ross *et al.*, 2009) o la durada del tractament a curt termini (Rebollo *et al.*, 2014; Bursać *et al.*, 2014) o a llarg termini (Baena *et al.*, 2014).

En relació amb els paràmetres plasmàtics, els nivells de triglicèrids només es mostren significativament elevats en el grup fructosa, fet que podria derivar en afectacions cardiovasculars, ja que els elevats nivells de triglicèrids constitueixen un factor de risc cardiovascular. Quant a les concentracions plasmàtiques de glucosa, no existeix variació en cap dels grups, però sí que hi ha hiperinsulinèmia, un altre cop de forma exclusiva en el grup fructosa. Molt en consonància es mostren els resultats del TTG, en què les concentracions de glucosa són molt semblants en els tres grups postadministració del bol IP de glucosa, però la corba és menys pronunciada en el grup fructosa, de manera que els valors de glucèmia al final del test són més alts en aquest que en els altres. A més, els nivells d'insulina al llarg del TTG són també significativament més alts en el grup fructosa que en els altres dos. Això indica que, tot i que l'organisme dels animals suplementats amb fructosa és capaç de mantenir la glucèmia pràcticament en els nivells normals, ho fa a expenses d'una major secreció d'insulina per part del pàncrees. Es produeix, per tant, un procés de resistència a la insulina i la hiperinsulinèmia compensatòria que anteriorment comentava, fet que deixa intuir la ja estudiada relació amb la diabetis mellitus tipus 2 (Gross *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2007).

Complementant l'estudi metabòlic, en el present treball es van estudiar els efectes de la suplementació de fructosa i glucosa sobre paràmetres relacionats amb l'SNC. S'especula que la fructosa pot produir alteracions en la memòria que poden estar relacionades amb la resistència a la insulina (Lakhan i Kirchgessner, 2013; Stranahan *et al.*, 2009; Agrawal i Gómez-Pinilla, 2012; Kanoski i Davidson, 2012). Tenint en compte que havíem pogut observar l'existència de resistència a la insulina en realitzar el TTG en les rates del grup fructosa (tot i que parcialment compensada per la hiperinsulinèmia), ens vam proposar determinar si realment la suplementació de fructosa produïa alteracions en la memòria i si hi havia una alteració de la senyalització de la insulina a nivell del còrtex cerebral que hi estigués relacionada. En efecte, els resultats del test de Novel Object Recognition van demostrar que la memòria, tant a curt termini (2 h) com a llarg termini (24 h), resulta reduïda de forma exclusiva en el grup fructosa. De nou, es tracta d'un efecte exclusiu de la fructosa i, per tant, independent o addicional a l'increment del consum calòric, ja que no es dona en el grup suplementat amb glucosa.

Pel que fa a l'estudi de la via de senyalització de la insulina en còrtex, es mostra com l'AKT-total no varia, però sí l'AKT-P, resultats que indiquen que la fructosa dificulta l'activació de l'AKT per fosforilació. Els nivells proteics d'IRS2, una altra proteïna clau en la senyalització d'insulina, disminueixen en el grup fructosa, encara que no de manera

estadísticament significativa. Aquest fet pot ser degut al fet que el tractament de set mesos no sigui suficientment llarg per alterar els nivells d'aquesta proteïna. Tot i així, cal dir que en estudis anteriors del nostre grup de recerca, tractaments curts (catorze dies o dos mesos) són suficients per a reduir els nivells d'IRS2 en el fetge (Rebollo *et al.*, 2014; Baena *et al.*, 2016). És possible que els efectes a nivell de l'SNC tardin més temps a desenvolupar-se o bé pot ser que sí que hi hagi una disminució d'IRS2 que no resulta significativa atesa la dispersió mostral. En qualsevol cas, la reducció en la fosforilació d'AKT deixa clar que existeix un impediment en la senyalització d'insulina a nivell del còrtex, que només es produeix en el grup fructosa i que podria relacionar-se amb l'alteració cognitiva que mostren els animals d'aquest grup en la prova del Novel Object Recognition.

Per tal d'investigar en els mecanismes que poden estar implicats en l'alteració cognitiva, es van determinar els nivells de la forma madura de BDNF, intentant així posar en evidència la relació d'aquest factor amb el dèficit de memòria (esmentat en l'apartat 4 de resultats bibliogràfics).

Els resultats van mostrar una disminució dels nivells de BDNF madur en el grup glucosa i una disminució molt més intensa en el grup fructosa. Això suggereix que el consum excessiu d'ambdós carbohidrats pot tenir repercussions negatives en el còrtex cerebral, tot i que el dany sembla ser superior en el cas de la fructosa, ja que hem pogut demostrar una alteració cognitiva funcional només en aquest grup mitjançant el test de Novel Object Recognition.

5. Conclusions

El consum de fructosa al 10% (p/v) en beguda durant set mesos produeix hiperinsulinèmia i hipertrigliceridèmia i altera les vies de senyalització de la insulina en còrtex de rates femella, mentre que la glucosa, en condicions equicalòriques, no provoca aquestes alteracions. A més, només en el grup suplementat amb fructosa s'afecta la memòria —segons el test de Novel Object Recognition— i es redueixen els nivells d'un marcador de neurogènesi en còrtex cerebral, BDNF. Tenint en compte que el consum calòric ha estat igual, però que les alteracions del metabolisme i dels processos cognitius de memòria i aprenentatge només es produeixen en els animals suplementats amb fructosa, es pot concloure que les esmentades alteracions tenen lloc a causa de mecanismes addicionals a l'excés calòric

6. Bibliografia

- AGRAWAL, R., GÓMEZ-PINILLA, F. (2012) «“Metabolic syndrome” in the brain: deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition». *The Journal of Physiology*, 590 (10), pp. 2485-2499.
- ANTUNES, M., BIALA, G. (2012) «The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications». *Cognitive Processing*, 13 (2), pp. 93-110.
- BAENA, M., SANGÜESA, G., DÁVALOS, A., LATASA, M.-J., SALA-VILA, A., SÁNCHEZ, R.M., ROGLANS, N., LAGUNA, J.C., ALEGRET, M. (2016) «Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the three major insulin-sensitive tissues». *Scientific Reports*, 6, p. 26149.
- BAENA, M., SANGÜESA, G., HUTTER, N., SÁNCHEZ, R.M., ROGLANS, N., LAGUNA, J.C., ALEGRET, M. (2014) «Fructose supplementation impairs rat liver autophagy through mTORC activation without inducing endoplasmic reticulum stress». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851 (2), pp. 107-116.

- BRAY, G.A., NIELSEN, S.J., POPKIN, B.M. (2004) «Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity». *American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (4), pp. 537-543.
- BURSAĆ, B.N., VASILJEVIĆ, A.D., NESTOROVIC, N.M., VELIČKOVIĆ, N.A., VOJNOVIĆ MILUTINOVIĆ, D.D., MATIĆ, G.M., DJORDJEVIC, A.D. (2014) «High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats - do glucocorticoids play a role?». *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25 (4), pp. 446-455.
- GROSS, L.S., LI, L., FORD, E.S., LIU, S. (2004) «Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment 1-3». *The Journal of Clinical Nutrition*, (5), pp. 774-779.
- JOHNSON, R.J., SEGAL, M.S., SAUTIN, Y., NAKAGAWA, T., FEIG, D.I., KANG, D., GERSCH, M.S., BENNER, S., SA, L.G. (2007) «Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease 1 3». *The American Journal of Clinical Nutrition*, pp. 899-906.
- JURDAK, N., KANAREK, R.B. (2009) «Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats» *Physiology & Behavior*, 96 (1), pp. 1-5.
- KANOSKI, S.E., DAVIDSON, T.L. (2012) «Western Diet Consumption and Cognitive Impairment: Links to Hippocampal Dysfunction and Obesity». *Physiology & Behavior*, 103 (1), pp. 59-68.
- LAKHAN, S.E., KIRCHGESSNER, A. (2013) «The emerging role of dietary fructose in obesity and cognitive decline». *Nutrition Journal*, 12 (1), p. 114.
- MALIK, V.S., SCHULZE, M.B., HU, F.B. (2006) «Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: A systematic review». *American Journal of Clinical Nutrition*, 84 (2), pp. 274-288.
- MATTSON, M.P. (2010) «The impact of dietary energy intake on cognitive aging». *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2, p. 5.
- REBOLLO, A., ROGLANS, N., BAENA, M., PADROSA, A., SÁNCHEZ, R.M., MERLOS, M., ALEGRET, M., LAGUNA, J.C. (2014) «Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats». *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25 (2), pp. 250-258.
- ROGLANS, N., VILÀ, L., FARRÉ, M., ALEGRET, M., SÁNCHEZ, R.M., VÁZQUEZ-CARRERA, M., LAGUNA, J.C. (2007) «Impairment of hepatic STAT-3 activation and reduction of PPAR γ activity in fructose-fed rats» *Hepatology*, 45 (3), pp. 778-788.
- ROSS, A.P., BARTNESS, T.J., MIELKE, J.G., PARENT, M.B. (2009) «A high fructose diet impairs spatial memory in male rats». *Neurobiology of Learning and Memory*, 92 (3), pp. 410-416.
- ROSS, A.P., BRUGGEMAN, E.C., KASUMU, A.W., MIELKE, J.G., PARENT, M.B. (2012) «Non-alcoholic fatty liver disease impairs hippocampal-dependent memory in male rats». *Physiology & Behavior*, 106 (2), pp. 133-141.
- STEPHAN, B.C.M., WELLS, J.C.K., BRAYNE, C., ALBANESE, E., SIERVO, M. (2010) «Increased fructose intake as a risk factor for dementia.» *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 65 A (8), pp. 809-814.
- STRANAHAN, A.M., NORMAN, E.D., LEE, K., CUTLER, R.G., TELLJOHANN, R., EGAN, J.M., MATTSON, M. P. (2009) «Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats». *Hippocampus*, 18 (11), pp. 1085-1088.
- TAPPY, L., LÊ, K.A. (2010) «Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity». *Physiology Review*, 90, pp. 23-46.
- VAN DER BORGH, K., KÖHNKE, R., GÖRANSSON, N., DEIERBORG, T., BRUNDIN, P., ERLANSON-ALBERTSON, C., LINDQVIST, A. (2011) «Reduced neurogenesis in the rat hippocampus following high fructose consumption». *Regulatory Peptides*, 167 (1), pp. 26-30.
- WELSH, J.A., SHARMA, A., ABRAMSON, J.L., GILLESPIE, C., VOS, M.B. (2011) «Caloric Sweetener Consumption and Dyslipidemia Among US». *JAMA*, 303 (15), pp. 1490-1497.
- WHITE, C.L., PISTELL, P.J., PURPERA, M.N., GUPTA, S., HISE, T.L., KELLER, J.N., INGRAM, D.K., MORRISON, C.D. (2010) «Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats: contributions of maternal diet». *Neurobiology of Disease*, 35 (1), pp. 3-13.

YIN, Q., MA, Y., HONG, Y., HOU, X., CHEN, J., SHEN, C., SUN, M., SHANG, Y., DONG, S., ZENG, Z., PEI, J.-J., Liu, X. (2014) «Lycopene attenuates insulin signaling deficits, oxidative stress, neuroinflammation, and cognitive impairment in fructose-drinking insulin resistant rats». *Neuropharmacology. Elsevier Ltd*, 86, pp. 389-396.