



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

# **Efectes metabòlics, vasculars i cognitius del consum de sucres simples en rates femella**

**Gemma Sangüesa Puigventós**

**2017**



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT DE RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE  
MEDICAMENTS

## **Efectes metabòlics, vasculars i cognitius del consum de sucres simples en rates femella**

Memòria presentada per **Gemma Sangüesa Puigventós** per optar al títol de doctor per la  
Universitat de Barcelona

El Director/Tutor,  
Dr. Juan Carlos Laguna Egea

La Directora,  
Dra. Marta Alegret Jordà

La doctoranda,  
Gemma Sangüesa Puigventós



Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada al Departament de Farmacologia, Química Terapèutica i Toxicologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, dins el grup de recerca “Receptors nuclears, metabolisme energètic i teràpia de les malalties metabòliques”, amb reconeixement de la Generalitat de Catalunya com a grup consolidat (2013SGR-00066). El grup, a més, és membre del CIBEROBN (Centro de Investigación Biomédica en Red Fisipatología de la Obesidad y Nutrición) i de l’IBUB (Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona).

Durant el període d’elaboració de la tesi la doctoranda ha gaudit de les beques predoctorals “Ajut de personal investigador en formació” (APIF) de la Universitat de Barcelona i “Formación de Profesorado Universitario” (FPU12/00377) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. També ha rebut un ajut de la Fundació Universitària Agustí Pedro i Pons per realitzar una estada a University of the Pacific, Stockton, California, USA.

La present tesi doctoral s’ha dut a terme gràcies a la concessió dels projectes d’investigació del Ministerio de Economía y Competividad (SAF2010-15664 i SAF2013-42982) i de la financiació de la Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids.



“Mai consideris l'estudi com una obligació,  
sinó com una oportunitat per penetrar en el bell i meravellós món del saber.”

Albert Einstein





*A la meva petita gran família*



## **AGRAÏMENTS**

*“Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca,  
has de pregar que el camí sigui llarg,  
ple d'aventures, ple de coneixences...”*

*Ítaca, Konstantinos Kavafis*

Tot just començar a escriure aquestes línies he recordat aquest poema de Kavafis, i és que dur a terme una tesi doctoral és realitzar un viatge ple d'aventures i de coneixences. Un viatge que no sempre és fàcil, amb moltes alegries, però també decepcions, en el que es camina per un camí sinuós amb pujades i baixades, on qualsevol avenç, per petit que sigui, dóna les forces i els ànims necessaris per continuar endavant.

En aquests moments tinc la sensació que m'acosto a la finalització de la meva tesi doctoral, que arribo a l'Ítaca d'aquest viatge. Miro enrere i m'adono de tot l'aprenentatge realitzat durant aquests anys, de com he crescut tan científicament com personalment, però sobretot de com d'importants heu sigut per mi totes les persones que m'heu acompanyat en aquest viatge. És molt difícil expressar en paraules tot l'agraïment que sento. Sens dubte, sense el vostre ajut i suport tot això no hauria estat possible.

En primer lloc voldria agrair als meus directors de tesi, al Dr. Joan Carles Laguna i a la Dra. Marta Alegret, per donar-me l'oportunitat de formar part d'aquest grup d'investigació, per confiar en mi des del primer moment, per la vostra disponibilitat i proximitat i per fer que mai perdés les ganes d'aprendre i seguir investigant. Gràcies per donar-me tan bons consells i per preocupar-vos més enllà del laboratori. Sincerament, em sento molt afortunada d'haver-vos tingut com a directors de tesi, però sobretot d'haver conegut a dues grans persones. Moltes gràcies per tot.

També als altres membres del grup, a la Nuri, per ajudar-me a donar els meus primers passos en el laboratori, transmetent-me el seu coneixement i experiència, per totes les hores compartides, per estar sempre disposada a escoltar-me i per saber-me animar quan les coses no sortien com esperàvem. I a la Rosa, per sempre interessar-se per la meva feina i animar-me a seguir endavant.

Estudiar els efectes de la ingesta de sucres no hauria tingut la mateixa dolçor sense els extraordinaris companys amb qui he tingut la sort de compartir la *poyata*. Miguel, gracias por todas las horas pasadas uno en frente del otro, por tener esa energía y alegría que se contagia. ¡Eres un compañero de poyata excepcional, pero sobretodo un muy buen amigo! Natty, dicen que los inicios nunca son fáciles, pero sin duda empezar contigo en el laboratorio fue una experiencia única. ¡Muchas gracias por todas las charlas y por enseñarme tanto de la vida! Silvia, mi chica de Madrid, gracias por acompañarme en nuestros intensivos en el laboratorio. ¡Es increíble como en tan poco tiempo llegamos a llevarnos tan bien! Voldria donar les gràcies també a tots els estudiants de treballs dirigits

i màsters, especialment a la Mar i al José Carlos, per totes les hores treballades colze a colze, per tenir sempre un sí per resposta i perquè junts hem après a fer possible tot el que ens proposéssim. Moltíssimes gràcies a tots! Sens dubte fem un molt bon equip!

També, a tots els altres companys que han format o formen part del laboratori. Voldria donar les gràcies al Sergi, la Laia, la Luisa i el David, per rebre'm amb els braços oberts i per animar-me a embarcar-me en el viatge cap a la tesi doctoral. Encara avui recordo molts dels vostres consells! Sònia, Raúl, Miren i Emma, moltes gràcies per tot el vostre ajut i pels nostres, tan preuats, moments de desconexió. Ha sigut un plaer tenir-vos al meu costat, especialment en aquests últims mesos. També a vosaltres, Christian, Vero, Dolors, Aurelio, Nacho, Dmitry, Laura, Yaiza, Oriol, Andrés, Jose, Carla, Leti, Mario, Patty, Gaia, Mohammad, Javi i Lucía per tots els moments viscuts tan dins com fora del laboratori. Tots i cada un de vosaltres m'heu ajudat a tirar endavant aquesta tesi, compartint amb mi les vostres experiències i aprenentatges. Moltes gràcies a tots!

Agrair a la Mar, a la Sílvia i a tot el personal de l'estabulari, l'esforç que realitzeu per facilitar-nos la feina amb tots els tràmits tan tècnics com administratius. També a tots els membres de la Unitat, perquè els somriures i els bon dies que creuem entre passadissos ajuden a fer el dia a dia més agradable i a minimitzar les dificultats i els entrebancs que puguin sorgir! Moltes gràcies!

I would like to sincerely thank Dr. Rahimian for giving me the opportunity to work in her laboratory. Thank you for your kindness, encouragement and support during my stay and specially for making me feel part of the team from the very beginning. Many thanks to Sonali and Farjana, for all the moments we spent together and for helping me whenever I needed it. I would also like to thank all the people I met at University of the Pacific. Thank you so much for making this experience unforgettable!

També voldria donar les gràcies a tots els meus amics, especialment a les farmacèutiques, a les nenes montserratines i a tota la colla d'Esparreguera, per interessar-vos per la meva feina i perquè les estones compartides amb vosaltres sempre donen energia per tirar endavant!

Moltes gràcies a la meva família, als meus pares, al meu germà, a la meva àvia, per ser-hi sempre, per recolzar-me en totes les decisions que he pres i per animar-me a continuar endavant. Sens dubte si he arribat fins aquí és gràcies a tots vosaltres! Gràcies al meu tiet, per tots els savis consells i estima que em vas donar. Estic segura que estaries molt orgullós de veure'm presentar aquesta tesi. Et trobo molt a faltar.

I finalment al Jordi, pel teu suport incondicional, la teva paciència i comprensió, i per tenir les paraules adequades per a cada moment. Gràcies per fer que cada dia em senti més afortunada d'estar al teu costat!

A tots, sincerament, moltes gràcies.

# ÍNDEX



# ÍNDEX

<b>ABREVIATURES.....</b>	<b>IX</b>
<b>I. PRESENTACIÓ / PRESENTATION.....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>5</b>
1. SUCRES SIMPLES: FRUCTOSA I GLUCOSA.....	7
1.1. Evolució de l'ús i el consum de sucres.....	7
1.2. Característiques i propietats dietètiques .....	9
1.3. Metabolisme: diferències entre glucosa i fructosa .....	11
1.4. Alteracions produïdes per la ingesta de sucres.....	14
1.5. Estudis clínics i epidemiològics.....	21
1.6. Models experimentals. Antecedents. ....	22
2. METABOLISME LIPÍDIC .....	25
2.1. Síntesi d'àcids grassos i triglicèrids.....	25
2.2. Transport i captació de triglicèrids.....	27
2.3. Catabolisme dels àcids grassos: $\beta$ -oxidació.....	28
2.4. Lipòlisi .....	31
3. HOMEÒSTASI ENERGÈTICA .....	34
3.1. Insulina .....	34
3.2. Leptina .....	41
3.3. Adiponectina .....	46
4. EL RETICLE ENDOPLASMÀTIC .....	50
4.1. Estrès d'ER .....	50
4.2. Estrès d'ER i metabolisme .....	52
5. FUNCIÓ VASCULAR.....	55
5.1. L'endoteli.....	55
5.2. Regulació del to vascular .....	55
5.3. Disfunció endotelial.....	58
6. FUNCIÓ COGNITIVA.....	60
6.1. La cognició .....	60
6.2. Dèficit cognitiu.....	61
6.3. Dèficit cognitiu i alteracions metabòliques.....	61

<b>III. HIPÒTESI I OBJECTIUS / HYPOTHESIS AND AIMS.....</b>	<b>69</b>
<b>IV. MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>73</b>
1. DISSENY DELS ESTUDIS.....	75
1.1. Estudi 1.....	75
1.2. Estudi 2.....	76
2. TESTS COGNITIUS.....	77
2.1. Test del laberint d'aigua: <i>Morris water maze</i> .....	77
2.2. Test de reconeixement d'objectes: <i>Novel object recognition test</i> .....	79
3. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA I CORBA D'INSULINA.....	80
4. DETERMINACIÓ DE LES CONCENTRACIONS DE GLUCOSA, TRIGLICÈRIDS I COLESTEROL EN SANG .....	81
5. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES PLASMÀTICS .....	81
5.1. Obtenció de plasma .....	81
5.2. Assajos immunoenzimàtics: ELISA .....	81
5.3. Kits enzimàtics colorimètrics.....	82
6. DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE TRIGLICÈRIDS I COLESTEROL EN TEIXIT .....	83
7. ESTUDI DE LA REACTIVITAT VASCULAR.....	83
7.1. Preparació dels anells aòrtics.....	83
7.2. Estudi de la resposta vasodilatadora .....	84
7.3. Estudi de la resposta vasoconstrictora .....	85
8. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT HEPÀTICA DE LA $\beta$ -OXIDACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS.....	85
8.1. Obtenció del sobrenedant post-nuclear .....	85
8.2. Assaig de $\beta$ -oxidació.....	86
9. VALORACIÓ HISTOLÒGICA DEL FETGE I EL TEIXIT ADIPÓS.....	87
9.1. Tinció d'hematoxilina-eosina (H/E).....	87
9.2. Tinció tricròmica de Masson .....	88
9.3. Tinció amb Oil Red O .....	89
10. ANÀLISI DE L'EXPRESIÓ GÈNICA.....	89
10.1. Obtenció d'RNA.....	89
10.2. Reacció de retrotranscripció .....	91
10.3. Reacció en cadena de la polimerasa: qPCR.....	91



11. IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES TISSULARS .....	94
11.1. Obtenció d'extractes .....	94
11.2. Assaig de Western Blot.....	96
11.3. Immunoassaig enzimàtic: ELISA .....	101
11.4. Immunohistoquímica.....	101
12. ANÀLISI ESTADÍSTICA DELS RESULTATS .....	102
<b>V. RESULTATS .....</b>	<b>103</b>
1. ESTUDI 1: SUPLEMENTACIÓ DE GLUCOSA I FRUCTOSA 20% (P/V) EN L'AIGUA DE BEGUDA DURANT 8 SETMANES EN RATES SPRAGUE-DAWLEY FEMELLA.....	105
1.1. Paràmetres zoomètrics.....	105
1.2. Anàlisi de paràmetres en sang i plasma .....	107
1.3. Efectes en el metabolisme lipídic.....	109
1.4. Via de senyalització de la insulina .....	113
1.5. Estudi de la reactivitat vascular.....	115
2. ESTUDI 2: SUPLEMENTACIÓ DE GLUCOSA I FRUCTOSA 10% (P/V) EN L'AIGUA DE BEGUDA DURANT 28 SETMANES EN RATES SPRAGUE-DAWLEY FEMELLA.....	123
2.1. Paràmetres zoomètrics.....	123
2.2. Anàlisi de paràmetres en sang i plasma .....	125
2.3. Efectes en la via de senyalització de la insulina en el fetge .....	129
2.4. Efectes en el metabolisme de carbohidrats i lípids.....	132
2.5. Efectes en nodes moleculars del control energètic .....	145
2.6. Efectes en la inflamació, l'estrès oxidatiu i l'estrès de reticle endoplasmàtic....	147
2.7. Estudi de la funció cognitiva.....	153
2.8. Efectes en l'hipotàlem .....	167
<b>VI. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>169</b>
1. Efectes de la ingesta subcrònica de sucres simples (20% p/v, 8 setmanes).....	172
1.1. Efectes en la regulació de l'homeòstasi energètica .....	172
1.2. Efectes en el metabolisme de carbohidrats i lípids.....	173
1.3. Efectes en la reactivitat vascular .....	175

2. Efectes de la ingesta crònica de sucres simples (10% p/v, 28 setmanes) .....	179
2.1. Efectes en la regulació de l'homeòstasi energètica.....	179
2.2. Efectes en el metabolisme de carbohidrats i lípids .....	182
2.3. Efectes en la inflamació, l'estrès oxidatiu i l'estrès de reticle endoplasmàtic ...	189
2.4. Efectes en la funció cognitiva.....	192
2.5. Altres consideracions .....	198
<b>VII. CONCLUSIONS .....</b>	<b>201</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>205</b>
<b>XIX. ANNEX: PUBLICACIONS .....</b>	<b>243</b>

# ABREVIATURES



---

<b>AC</b>	<i>Adenylate cyclase</i>
<b>ACAD</b>	<i>Acyl-CoA dehydrogenases</i>
<b>ACC</b>	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>
<b>Ach</b>	<i>Acetylcholine</i>
<b>ACL</b>	<i>ATP citrate lyase</i>
<b>ACO</b>	<i>Acyl-CoA oxidase</i>
<b>ACS</b>	<i>Acyl-CoA synthase</i>
<b>AdipoR</b>	<i>Adiponectin receptor</i>
<b>AGEs</b>	<i>Advanced glycation end products</i>
<b>AgRP</b>	<i>Agouti-related peptide</i>
<b>Akt</b>	<i>v-Akt thymoma viral oncogene homolog/protein kinase B</i>
<b>ALT</b>	<i>Alanine transaminase</i>
<b>AMPK</b>	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
<b>Ang-II</b>	<i>Angiotensin-II</i>
<b>Apo</b>	<i>Apolipoprotein</i>
<b>APP</b>	<i>Amiloide precursor protein</i>
<b>APPL1</b>	<i>Adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine binding domain, and Leucine zipper motif</i>
<b>APS</b>	<i>Ammonium persulfate</i>
<b>AT<sub>1</sub></b>	<i>Angiotensin II type 1-receptor</i>
<b>ATF</b>	<i>Activating transcription factor</i>
<b>ATGL</b>	<i>Adipose triglyceride lipase</i>
<b>AUC</b>	<i>Area under the curve</i>
<b>BACE</b>	<i><math>\beta</math>-site APP-cleaving enzyme</i>
<b>BBB</b>	<i>Blood brain barrier</i>
<b>BDNF</b>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BH<sub>4</sub></b>	<i>Tetrahydrobiopterin</i>
<b>BK</b>	<i>Bradykinin</i>
<b>C/EBP</b>	<i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>
<b>CA</b>	<i>Cornu Ammonis</i>
<b>CART</b>	<i>Cocaine-and amphetamine-regulated transcript</i>
<b>CAT</b>	<i>Catalase</i>
<b>CD36</b>	<i>Fatty acid translocase</i>
<b>CHOP</b>	<i>C/EBP<math>\alpha</math>-homologous protein</i>
<b>ChoRE</b>	<i>Carbohydrate response element</i>
<b>ChREBP</b>	<i>Carbohydrate-responsive element-binding protein</i>
<b>CNS</b>	<i>Central nervous system</i>
<b>COX</b>	<i>Cyclooxygenase</i>
<b>CPT-1</b>	<i>Carnitine palmitoyltransferase-1</i>
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element binding protein</i>
<b>CRTC2</b>	<i>CREB regulated transcription coactivator 2</i>
<b>DAG</b>	<i>Diacylglycerol</i>
<b>DEPC</b>	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
<b>DG</b>	<i>Dentate gyrus</i>
<b>DGAT</b>	<i>Diacylglycerol acyltransferase</i>
<b>DI</b>	<i>Discrimination index</i>
<b>Dnajb9</b>	<i>DnaJ/Hsp40 homolog, subfamily B, membre 9</i>
<b>DRP1</b>	<i>Dynammin-related protein 1</i>
<b>EDCF</b>	<i>Endothelium-derived constricting factors</i>
<b>Edem1</b>	<i>Endoplasmic reticulum degradation-enhancer alpha-mannosidase-like protein 1</i>
<b>EDHF</b>	<i>Endotelium-dependent hyperpolarizations factors</i>
<b>EDRF</b>	<i>Endothelium-derived relaxing factors</i>

## ABREVIATURES

---

<b>EDV</b>	<i>Endothelial-dependent vasodilatation</i>
<b>EIDV</b>	<i>Endothelium-independent vasodilatation</i>
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>eNOS</b>	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
<b>ER</b>	<i>Endoplasmic reticulum</i>
<b>ERAD</b>	<i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
<b>ET-1</b>	<i>Endothelin-1</i>
<b>ET<sub>A</sub></b>	<i>Endothelin receptor type A</i>
<b>FABP</b>	<i>Fatty acid binding protein</i>
<b>FAS</b>	<i>Fatty acid synthase</i>
<b>FATP</b>	<i>Fatty acid transport protein</i>
<b>FIS1</b>	<i>Fission 1</i>
<b>FK</b>	<i>Fructokinase</i>
<b>FoxO1</b>	<i>Forkhead box protein O1</i>
<b>G6P</b>	<i>Glucose-6-phosphatase</i>
<b>Gab-1</b>	<i>Grb2-associated-binding protein 1</i>
<b>GADD34</b>	<i>Growth arrest and DNA damage-inducible protein</i>
<b>GAP-43</b>	<i>Growth associated protein</i>
<b>GCK</b>	<i>Glucokinase</i>
<b>GCS</b>	<i>Soluble guanylate cyclase</i>
<b>GI</b>	<i>Glycemic index</i>
<b>GLUT</b>	<i>Glucose transporter</i>
<b>GPAT</b>	<i>Glycerol-3-phosphate acyltransferase</i>
<b>GPX</b>	<i>Glutathione peroxidase</i>
<b>Grp78</b>	<i>Glucose-regulated protein, 78-KD</i>
<b>GS</b>	<i>Glycogen synthase</i>
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	<i>Glycogen synthase kinase 3 <math>\beta</math></i>
<b>GTT</b>	<i>Glucose tolerance test</i>
<b>HCDH</b>	<i>Hydroxacyl-coenzyme A dehydrogenase</i>
<b>HDL</b>	<i>High density lipoprotein</i>
<b>HFCS</b>	<i>High fructose corn syrup</i>
<b>HL</b>	<i>Hepatic lipase</i>
<b>HNF4</b>	<i>Hepatic nuclear factor 4</i>
<b>HSL</b>	<i>Hormone-sensitive lipase</i>
<b>IDE</b>	<i>Insulin-degrading enzyme</i>
<b>IDL</b>	<i>Intermediate-density lipoproteins</i>
<b>IHC</b>	<i>Immunohistochemistry</i>
<b>IL</b>	<i>Interleukin</i>
<b>iNOS</b>	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
<b>IP</b>	<i>Prostacyclin receptor</i>
<b>IR</b>	<i>Insulin receptor</i>
<b>IRE1</b>	<i>Inositol requiring protein 1</i>
<b>IRS</b>	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	<i>Inhibitor of <math>\kappa</math>B</i>
<b>Jak2</b>	<i>Janus kinase 2</i>
<b>JNK</b>	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
<b>LDL</b>	<i>Low density lipoprotein</i>
<b>LDLR</b>	<i>Low density lipoprotein receptor</i>
<b>LepR</b>	<i>Leptin receptor</i>
<b>LKB1</b>	<i>Liver kinase B1</i>
<b>L-NAME</b>	<i>N<sup><math>\omega</math></sup>-Nitro-L-arginine methyl ester</i>

---

<b>L-PK</b>	<i>Liver-piruvate kinase</i>
<b>LPL</b>	<i>Lipoprotein lipase</i>
<b>LRP</b>	<i>LDL Receptor-Related Proteins</i>
<b>LTP</b>	<i>Long term potentiation</i>
<b>MAG</b>	<i>Monoacylglycerol</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MCD</b>	<i>Malonyl-CoA decarboxylase</i>
<b>MCP1</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
<b>MFN</b>	<i>Mitofusin</i>
<b>MGL</b>	<i>Monoacylglycerol lipase</i>
<b>MLCP</b>	<i>Myosin light chain phosphatase</i>
<b>MSH</b>	<i>Melanocyte-stimulating hormones</i>
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
<b>MTP</b>	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>
<b>MWM</b>	<i>Morris water maze</i>
<b>NAFLD</b>	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>
<b>NAMPT</b>	<i>Nicotinamide phosphoribosyltransferase</i>
<b>NASH</b>	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>
<b>NEFA</b>	<i>Non esterified fatty acids</i>
<b>NFT</b>	<i>Neurofibrillary tangles</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
<b>NO</b>	<i>Nitric oxide</i>
<b>NORT</b>	<i>Novel object recognition test</i>
<b>Nox</b>	<i>NADPH oxidases</i>
<b>NPY</b>	<i>Neuropeptide Y</i>
<b>NRF</b>	<i>Nuclear respiratory factor</i>
<b>OPA1</b>	<i>Optic atrophy protein 1</i>
<b>ORO</b>	<i>Oil Red O</i>
<b>PB</b>	<i>Phosphate buffer</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PCSK9</b>	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>
<b>PDE</b>	<i>Phosphodiesterase</i>
<b>PK1</b>	<i>3'-phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
<b>PE</b>	<i>Phenylephrine</i>
<b>PEPCK</b>	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
<b>PERK</b>	<i>Protein kinase RNA-like ER kinase</i>
<b>PFK</b>	<i>Phosphofructokinase</i>
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math> coactivator 1</i>
<b>PGI2</b>	<i>Prostacyclin</i>
<b>PGIS</b>	<i>Prostacyclin synthase</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
<b>PIP2</b>	<i>Phosphatidylinositol biphosphate</i>
<b>PIP3</b>	<i>Phosphatidylinositol triphosphate</i>
<b>PKA</b>	<i>cAMP-dependent protein kinase</i>
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i>
<b>PKG</b>	<i>cGMP-dependent protein kinase</i>
<b>PLIN-1</b>	<i>Perilipin-1</i>
<b>POMC</b>	<i>Proopiomelanocortin</i>
<b>PP1</b>	<i>Protein phosphatase 1</i>
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\alpha</math></i>
<b>PPRE</b>	<i>Peroxisome proliferator response element</i>

## ABREVIATURES

---

<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
<b>PTP</b>	<i>Protein-tyrosine phosphatases</i>
<b>RIDD</b>	<i>Regulated IRE1-dependent decay</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>RXR</b>	<i>Retinoid-X receptor</i>
<b>SCD1</b>	<i>Sterol-CoA desaturase 1</i>
<b>SD</b>	<i>Standard Desviation</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfata</i>
<b>Sec61<math>\alpha</math>1</b>	<i>Sec61 complex, alpha-1 subunit</i>
<b>SEM</b>	<i>Standard error of the mean</i>
<b>SGLT1</b>	<i>Sodium-dependent glucose transporter 1</i>
<b>SIRT1</b>	<i>Silent information regulator 1</i>
<b>SNP</b>	<i>Sodium nitroprusside</i>
<b>SOCS</b>	<i>Supressors of cytokine signaling</i>
<b>SOD</b>	<i>Superoxide dismutase</i>
<b>SRE</b>	<i>SREBP response element</i>
<b>SREBP-1</b>	<i>Sterol regulatory element-binding protein-1</i>
<b>STAT</b>	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
<b>SYN1</b>	<i>Synapsin 1</i>
<b>SYP</b>	<i>Synaptophysin</i>
<b>TBARS</b>	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered saline</i>
<b>TEMED</b>	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
<b>TFAM</b>	<i>Mitochondrial transcriptional factor A</i>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
<b>TSC2</b>	<i>Tuberus sclerosis complex 2</i>
<b>TxA2</b>	<i>Thromboxane A<sub>2</sub></i>
<b>UPR</b>	<i>Unfolded protein response</i>
<b>VASP</b>	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
<b>VLDL</b>	<i>Very low density lipoprotein</i>
<b>VLDLR</b>	<i>Very low density lipoprotein receptor</i>
<b>XBP1</b>	<i>X-box binding protein 1</i>



# I. PRESENTATION



In the last decades increased consumption of added sugars, specially fructose, has been associated with the development of obesity and metabolic disorders such as diabetes, hypertension, and cardiovascular diseases [1,2]. Recently, some studies also link high sugar intake with cognitive alterations [3,4].

The rat is a good model for the study of the effects caused by fructose consumption since it metabolizes fructose in a similar way to humans and also suffers comparable metabolic alterations [5]. In addition, the administration of fructose in liquid form to rats mimics the human pattern of fructose consumption [6].

Using this experimental model, previous studies performed in our research group showed that female rats supplemented with liquid fructose (10% w/v) for 2 and 8 weeks develop insulin resistance, hypertriglyceridemia and fatty liver, among other metabolic disturbances [7–10].

In the present thesis, metabolic and vascular effects induced by subchronic (8 weeks) liquid sugar intake in female rats have been investigated. Moreover, metabolic as well as cognitive alterations produced by a chronic sugar consumption (28 weeks) in female rats have been evaluated. In order to differentiate sugar-effects related merely to caloric excess or to its peculiar metabolism, experimental groups supplemented with glucose and fructose solutions have been compared.



## II. INTRODUCCIÓ



## 1. SUCRES SIMPLES: FRUCTOSA I GLUCOSA

La fructosa i la glucosa són monosacàrids que es troben de forma natural en petites quantitats a la fruita i la mel. A més, formen part del disacàrid sacarosa, conegut com a sucre de taula.

### 1.1. Evolució de l'ús i el consum de sucres

La introducció del sucre de taula a la dieta és relativament recent. Abans de la seva introducció, la mel era l'edulcorant principal però es mantenia com a producte exclusiu de les classes altes. El descobriment del Nou Món va permetre l'expansió de la producció del sucre de canya i, posteriorment, el seu desenvolupament en la indústria. A més, a Europa, a principis del segle XIX es va començar a produir a gran escala el processament del sucre de remolatxa. En conjunt, l'augment de la disponibilitat del sucre va conduir a un increment del seu ús en la població, especialment com a edulcorant del te i del cafè, però també en la preparació de dolços i productes de pastisseria [1,11,12].

Així, la producció industrial de sucre es basava exclusivament en la seva obtenció o bé a partir de la canya de sucre, una planta cultivada principalment als països tropicals, o bé de l'arrel de la remolatxa, cultivada en climes més freds com ara Europa del Nord o els Estats Units [13,14].

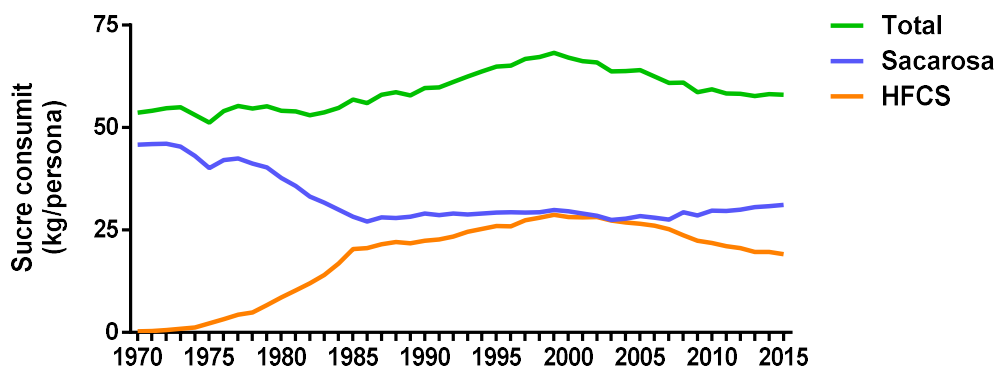
A la dècada dels 70, la indústria alimentària va introduir als Estats Units un nou edulcorant conegut com a *high fructose corn syrup* (HFCS), xarop de blat de moro enriquit amb fructosa. S'elabora a partir del midó de blat de moro, que s'hidrolitza a glucosa i posteriorment una part és convertida en fructosa mitjançant una reacció d'isomerització enzimàtica. L'HFCS es pot produir en diverses proporcions de fructosa i glucosa, sent les més comuns l'HFCS-55 i l'HFCS-42 que contenen 55% i 42% de fructosa respectivament [15].

L'HFCS presenta un alt poder edulcorant, un cost baix i unes bones propietats organolèptiques, funcionals i d'estabilitat. Aquestes característiques van contribuir a un ràpid increment del seu ús, especialment als Estats Units, en detriment de la sacarosa, l'únic edulcorant que pràcticament es consumia aleshores (Figura II-1) [1,16]. Actualment, l'edulcorant que més s'utilitza als Estats Units és l'HFCS, mentre que a Europa és la sacarosa [17].

A les últimes dècades, els canvis en els hàbits alimentaris, principalment als països industrialitzats, han propiciat un increment considerable en el consum de sucres. Destaca com a principal causa l'augment de la ingesta de begudes ensucrades i altres productes edulcorats amb sacarosa o HFCS [18–20]. Així, per exemple, el consum de sucres procedents de begudes edulcorades als Estats Units va incrementar de 64 g/dia al 1970 a

## II. INTRODUCCIÓ

81 g/dia al 1997 [18]. A més, resultats recents de l'estudi NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) mostren que la meitat de la població dels Estats Units consumeix diàriament begudes edulcorades, que un 25% obté com a mínim 200 kcal procedents d'aquestes begudes i que un 5% n'obté més de 567 kcal (el que equival a 4 llaunes) [21].



**Figura II-1.** Consum total d'edulcorants, d'HFCS i de sacarosa per persona durant el període 1970-2015 als Estats Units. Gràfica elaborada a partir de dades extretes de USDA - *Sugar and sweeteners yearbook tables* [22].

També, cal considerar que diversos estudis apunten que els nens i els adolescents són el grup de la població que ingereix més begudes ensucrades i s'estima que un percentatge significatiu consumeix més del 25% de la ingesta calòrica total en forma de sucres afegits [23,24].

A Europa, tot i que el consum de begudes ensucrades sembla ser menor que el dels Estats Units, la ingesta de sucres també és alta. El consum oscil·la entre el 7-8% de la ingesta total als països amb menor consum, com ara Hongria i Noruega fins al 16-17% al Regne Unit i Espanya. A més, en els nens, aquestes xifres encara són més elevades, ja que oscil·len des del 12% a Dinamarca, Eslovènia i Suècia fins a quasi el 25% a Portugal [25,26].

Aquest increment del consum de sucres afegits s'ha associat amb l'augment de la prevalença de malalties cardiovasculars, obesitat i diabetis, entre d'altres; fet que ha conduït a desenvolupar guies de recomanacions i polítiques de salut pública amb l'objectiu de reduir el consum de sucres [13,27]. Així, per exemple, l'any 2015 l'Organització Mundial de la Salut va publicar la guia *Sugar intake for adults and children* en la que recomanava reduir la ingesta de sucres simples a menys del 10% de la ingesta calòrica total i aconsellava de manera condicional que aquesta fos per sota del 5% [15,28].

Per a una dieta de 2000 kcal/dia, es recomanaria que com a màxim unes 200 kcal provinguessin de la ingesta de sucre, el que equivaldria a 50 g de sucre. Tenint en compte que una llauna de refresc conté una mitjana de 35-40 g de sucres (140-160 kcal), el seu consum ja suposaria pràcticament la totalitat màxima recomanada al dia [17]. És important



remarcant la dificultat per controlar la presència de sucres en els aliments processats de la nostra dieta. Un exemple seria el quètxup: tan sols una cullerada ja conté 4 g de sucres.

Pel que fa a Espanya, actualment no hi ha unes recomanacions específiques establertes. L'Agència Espanyola de Consum, Seguretat Alimentària i Nutrició (AECOSAN), per exemple, apel·la que de moment no tenen dades fiables sobre el consum de sucres de la població espanyola i que per tant creuen necessari conèixer aquesta informació per poder establir unes recomanacions. No obstant, volen transmetre a la població la necessitat de reduir la ingesta de sucres tant procedents d'aliments com de begudes [29]. També, la Fundació Espanyola de la Nutrició va publicar al 2013 el *Libro blanco de la nutrición en España* on aconsella el consum moderat de begudes edulcorades [30].

En els últims anys, segurament com a resultat d'aquestes recomanacions, i també a causa de l'increment del consum de begudes sense calories, s'ha observat una tendència a disminuir el consum de sucres [17,20]. Als Estats Units, segons dades de l'USDA [22], el 2013 es va consumir 128.4 lliures (58.24 kg) per persona, mentre que el 1999 se n'havien consumit 151.1 (68.54 kg). A la Figura 1 es pot observar com el consum de sucres totals va incrementar del 1970 fins al 2000, any a partir del qual s'aprecia una tendència a disminuir.

Tot i així, segons les últimes recomanacions de l'*American Heart Association*, la ingesta de sucres encara és excessiva i caldria reduir-la a 100-250 calories per dia en la població adulta, a menys de 25 g per dia en nens i evitar el seu consum en nens menors de 2 anys [31].

Per altra banda, un altre fet preocupant és que mentre hi ha una tendència a disminuir el consum de begudes edulcorades als països desenvolupats, als països amb vies de desenvolupament el consum està incrementant-se considerablement [20].

Per tots aquests motius, és necessari investigar el metabolisme i els efectes que pot produir la ingesta de sucres i així poder prendre les mesures adients.

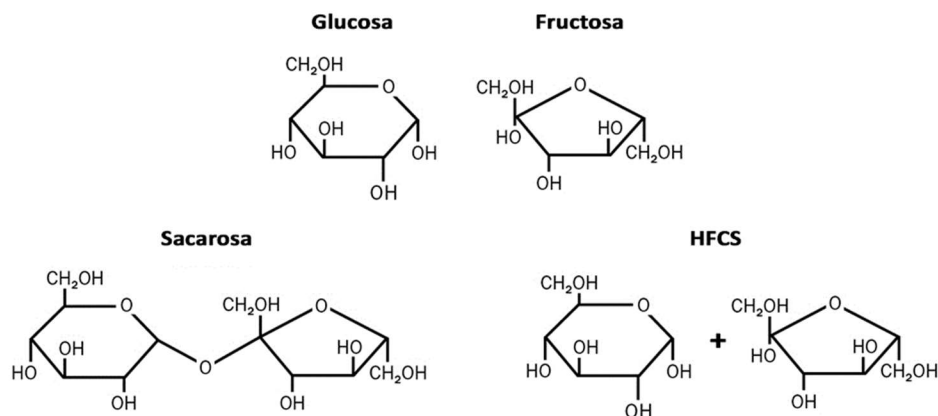
## 1.2. Característiques i propietats dietètiques

La fructosa i la glucosa tenen la mateixa forma empírica ( $C_6H_{12}O_6$ ), però difereixen en la seva estructura molecular. Mentre la fructosa presenta un grup cetònic en el carboni 2, la glucosa té un grup aldehyd en el carboni 1. Per altra banda, tot i que ambdues són hexoses, la fructosa se cicla en forma de furà, mentre que la glucosa ho fa en forma de pirà (Figura II-2) [1,32].

Pel que fa a l'HFCS i la sacarosa, ambdós presenten unes proporcions similars de fructosa i glucosa. La principal diferència és que a la sacarosa, les dues molècules estan unides mitjançant un enllaç glucosídic entre el carboni 1 de la glucosa i el carboni 2 de la fructosa, mentre que a l'HFCS les molècules de fructosa i glucosa es troben lliurement en forma de monosacàrids [33]. La presència d'aquest enllaç és important ja que proporciona

## II. INTRODUCCIÓ

diferències en el metabolisme i l'absorció dels sucres. A la sacarosa, és necessari que l'enzim sacarasa-isomalasa actuï per hidrolitzar el disacàrid, fet que podria disminuir la biodisponibilitat dels sucres i, com a conseqüència, els efectes perjudicials produïts per la ingesta dels sucres lliures [34,35]. Tot i així, hi ha certa controvèrsia, ja que alguns estudis publiquen que la sacarosa i l'HFCS no presenten diferències en les alteracions que produeixen [36,37]. A més, s'ha descrit que quan la sacarosa s'afegeix en solucions àcides, com ara les begudes refrescants, s'hidrolitza completament als seus components monosacàrids [38].



**Figura II-2.** Estructura química de les molècules de fructosa, glucosa, sacarosa i HFCS.

Respecte el poder calòric, tan la glucosa com la fructosa tenen el mateix, 4 kcal/g. En canvi, presenten un poder edulcorant diferent. En estudis comparatius, es va fixar que la sacarosa tenia un poder edulcorant de 100, mentre que el de la fructosa era de 173 i el de la glucosa de 74. En el cas de l'HFCS, el valor era de 116 o 128 en funció de si era HFCS-42 o HFCS-55. Així, s'observa com la fructosa té un poder edulcorant molt més elevat, una de les raons que va propiciar la seva àmplia utilització [39].

Un altre aspecte que caracteritza els carbohidrats és el seu índex glucèmic (GI, *glycemic index*) que els classifica en funció dels nivells de glucèmia que s'obtenen després de la seva ingesta. Així, els aliments amb un GI elevat són aquells que produeixen un increment considerable dels nivells de glucosa en sang. Foster i col. [40] va realitzar a partir de l'avaluació de diferents estudis una taula internacional de GIs on va establir per la fructosa un GI molt més baix ( $19 \pm 2$ ) que el de la glucosa ( $99 \pm 3$ ) i el de la sacarosa ( $68 \pm 5$ ).

Per altra banda, la fructosa no estimula la secreció d'insulina per part de les cèl·lules  $\beta$  del pàncrees ni requereix la seva presència a les etapes inicials del seu metabolisme [16,41].

El fet que la fructosa presentés un alt poder edulcorant, un baix GI i no estimulés la secreció d'insulina va fer que durant força temps el seu ús es recomanés per a pacients diabètics [18,42,43]. No obstant, contrari al que es creia inicialment, hi ha una creixent evidència que la ingesta de fructosa produeix alteracions metabòliques com sobrepès i hipertrigliceridèmia, i propicia el desenvolupament de malalties cardiometabòliques i

diabetis [17,44,45]. A més, sembla ser que aquests efectes negatius no es deuen únicament al increment calòric que suposa l'addició de sucres a la dieta, sinó també al seu metabolisme intrínsec.

### 1.3. Metabolisme: diferències entre glucosa i fructosa

La fructosa i la glucosa presenten diferències en la seva absorció i el seu metabolisme. A continuació, es detallaran aquests processos.

#### 1.3.1. Absorció

La fructosa i la glucosa arriben a l'intestí procedents de la ingesta de sucres simples o HFCS, o bé de la digestió del disacàrid sacarosa per part de l'enzim sacarasa present en les microvellositats dels enteròcits [46].

La fructosa és transportada a l'interior de l'enteròcit a través de GLUT (*glucose transporter*) 5, un transportador específic de la fructosa localitzat al pol apical dels enteròcits. En canvi, la glucosa requereix el co-transportador SGLT1 (*sodium-dependent glucose transporter 1*), un sistema de transport específic dependent de sodi que requereix la hidròlisi d'ATP. Un cop dins l'enteròcit, tant la fructosa com la glucosa, passen a la circulació sanguínia a través del transportador GLUT2, localitzat a la membrana basolateral de l'enteròcit [2,34,47].

#### 1.3.2. Metabolisme

El metabolisme de la fructosa i el de la glucosa es diferencien principalment per dos aspectes. En primer lloc, perquè la fructosa es metabolitza majoritàriament en el fetge, mentre que la glucosa és metabolitzada tant a nivell hepàtic com extrahepàtic (múscul esquelètic, teixit adipós, cervell...). I en segon lloc, perquè les reaccions enzimàtiques dels primers passos del metabolisme hepàtic difereixen entre els dos sucres [17,18,45].

##### 1.3.2.1. Metabolisme hepàtic

En el fetge, la fructosa és fosforilada a fructosa-1-P per l'enzim fructocinasa (FK, *fructokinase*), que és altament específic per la fructosa. A continuació, l'enzim aldolasa B la metabolitza a les trioses-P, dihidroxiacetona-P i gliceraldehid, que al seu torn donaran lloc a gliceraldehid-3-P.

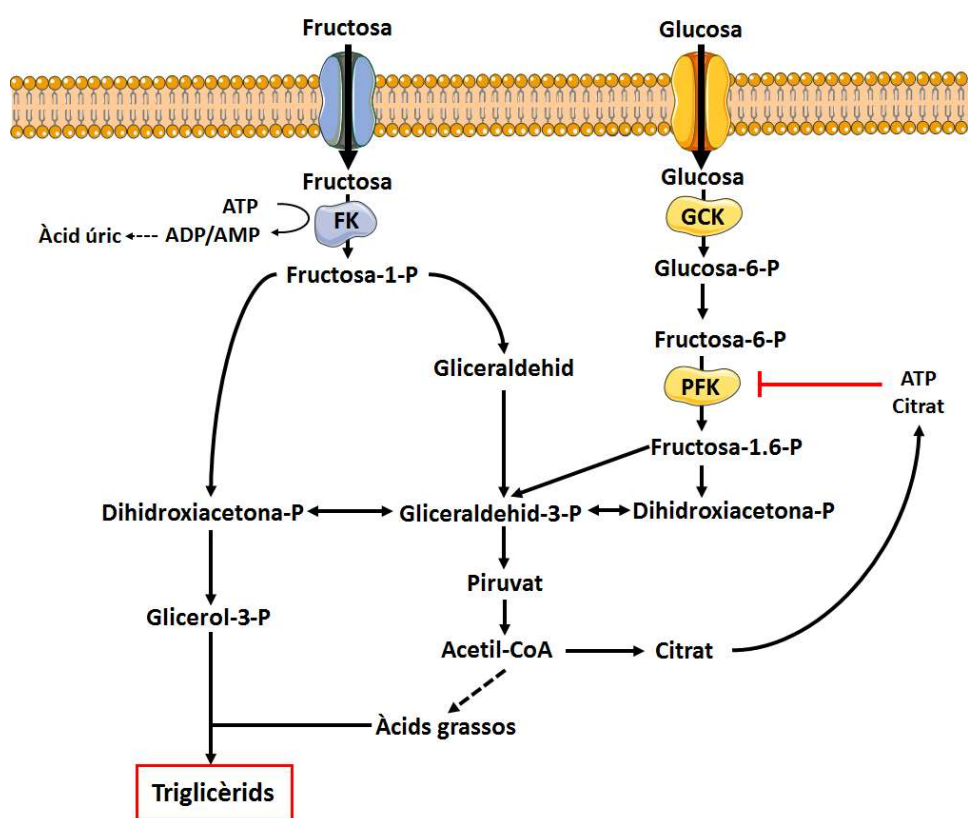
Pel que fa al metabolisme hepàtic de la glucosa, la seva entrada a la via glucolítica es realitza a través de l'enzim glucocinasa (GCK, *glucokinase*) que fosforila la glucosa a glucosa-6-P. Seguidament, la glucosa-6-P és convertida en fructosa-6-P i, posteriorment, en fructosa-1,6-di-P per acció dels enzims fosfoglucoisomerasa i fosfofructocinasa (PFK,

## II. INTRODUCCIÓ

*phosphofructokinase*). Finalment, la fructosa-1,6-di-P és metabolitzada per donar lloc a les trioses-P, convergint així amb el metabolisme de la fructosa (Figura II-3) [17,32,48].

Un aspecte clau en el metabolisme de la glucosa és que posseeix un mecanisme de retroalimentació negativa, ja que elevats nivells d'ATP i citrat inhibeixen l'acció de l'enzim PFK, permetent la regulació de la reacció de la glucòlisi en funció de l'estat energètic de la cèl·lula. En canvi, la fructosa no només eludeix a aquest mecanisme, sinó que, a més a més, és capaç de regular positivament el seu propi metabolisme. En aquest sentit, s'ha observat que l'administració de fructosa induïx a un augment de l'expressió del transportador GLUT5 a nivell intestinal i també de l'enzim FK. Així, els consumidors crònics de fructosa són més susceptibles a patir els seus efectes negatius [42,46,49].

Una altra diferència entre el metabolisme de la glucosa i la fructosa és la dependència a l'acció de la insulina. La insulina, a través del transportador GLUT4, permet la captació de glucosa, la qual és realitzada principalment pel teixit muscular i adipós. A més, també regula la conversió de glucosa a piruvat ja que estimula l'expressió de l'enzim GCK. Aquest enzim es caracteritza per tenir una  $K_m$  alta, pel que la fosforilació de la glucosa variarà en funció de la seva concentració. Contràriament, la fructosa no només és independent de l'acció de la insulina, sinó que també es metabolitza ràpidament ja que l'enzim FK presenta una  $K_m$  baixa i no és inhibit per ATP ni citrat [1,16].



**Figura II-3.** Metabolisme hepàtic de la glucosa i la fructosa. Figura adaptada de Tappy i col. [1].

Per aquests motius, el metabolisme de la glucosa queda limitat per la capacitat d'emmagatzematge del glucogen i pels processos de regulació, mentre que les trioses-P procedents de la ingesta de fructosa continuen metabolitzant-se. La major part són convertides a glucosa (50%) i glicogen (15-20%) a través de la gluconeogènesi i també a àcid làctic (15-20%).

Per altra banda, les trioses-P també poden continuar per la via glucolítica, facilitant així la síntesi d'àcids grassos [1,18]. A més, la fructosa proporciona els components necessaris per la síntesi de triglicèrids: per una banda, el glicerol, obtingut a partir del glicerol-3-P, i per l'altra, l'acetil-CoA i el citrat, obtinguts a partir del piruvat, que proporcionaran els carbonis necessaris per la lipogènesi *de novo* i per formar les cadenes llargues d'àcids grassos que seran després esterificats a triglicèrids [16,46].

Així, la fructosa destaca per la seva gran capacitat lipogènica gràcies a la facilitat que presenta per induir el seu propi metabolisme i per donar lloc als triglicèrids que posteriorment seran incorporats en les lipoproteïnes de molt baixa densitat (*VLDL, very low density lipoproteins*).

Per altra banda, a causa de l'elevat consum d'ATP que produeix el metabolisme de la fructosa, els nivells d'AMP incrementen considerablement, donant lloc a la producció d'àcid úric, el qual s'ha associat amb el desenvolupament de complicacions cardiometabòliques [17,42,44].

### **1.3.2.2. Metabolisme extrahepàtic**

La glucosa pot ser utilitzada com a font d'energia per la majoria de les cèl·lules de l'organisme. Per això, en general, no és metabolitzada majoritàriament pel fetge sinó que és transportada directament als teixits perifèrics per ser usada com a energia. No obstant, en condicions d'excés energètic, la glucosa també pot ser captada pel fetge per ser emmagatzemada en forma de glucogen o bé convertir-se en àcids grassos i posteriorment a triglicèrids [18].

En canvi, la fructosa és metabolitzada pràcticament en la totalitat pel fetge i només una petita part arriba a la circulació sistèmica. De fet, un estudi demostra com després de la ingesta d'1 g de fructosa per cada kg de massa corporal, la concentració plasmàtica de fructosa és de 0.5 mM, mentre que la ingesta de la mateixa quantitat de glucosa assoleix una concentració de 10 mM [46].

El principal motiu pel qual els òrgans extrahepàtics no són capaços de metabolitzar la fructosa és perquè no presenten l'enzim FK [1]. A més, l'expressió de transportadors de fructosa (GLUT5) a la resta dels teixits, com ara el múscul esquelètic, el teixit adipós i el cervell, és molt baixa [47].

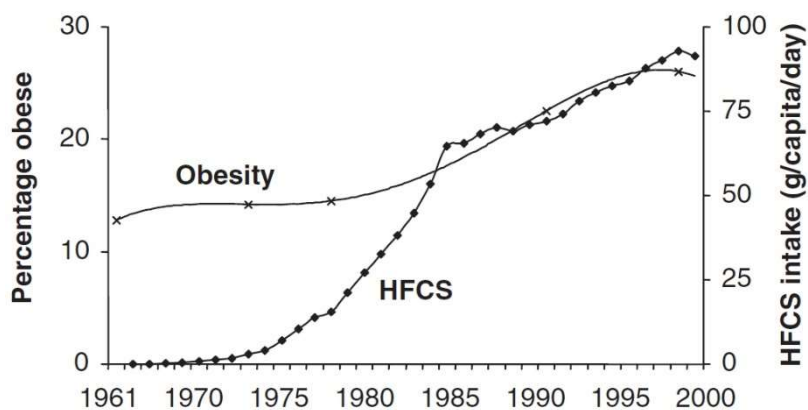
## 1.4. Alteracions produïdes per la ingesta de sucres

El consum de sucres s'ha relacionat amb un increment del risc a patir dislipidèmia, diabetis, malalties cardiometabòliques i síndrome metabòlica, entre d'altres. A continuació, s'explicarà amb més detall les diferents alteracions produïdes per la ingesta de sucres.

### 1.4.1. Increment de pes

Diferents estudis observacionals han relacionat l'increment del consum de begudes edulcorades, i especialment el de fructosa, amb l'increment de la prevalença d'obesitat a nivell mundial [11,50,51].

No obstant, malgrat hi ha una clara associació temporal tal i com s'il·lustra a la Figura II-4, alguns autors apunten que no hi ha una evident relació causa-efecte [33,52,53].



**Figura II-4.** Associació temporal entre el consum d'HFCS i la prevalença d'obesitat als Estats Units. Figura extreta de Bray [54].

Així, per exemple, Olsen i col. [55] va realitzar una meta-anàlisi en la que es va observar que la majoria dels estudis presentaven una associació positiva entre el consum de begudes edulcorades i l'obesitat. Una altra meta-anàlisi descriu com, en adults que mantenen una dieta *ad libitum*, la reducció del consum de sucres va comportar una disminució de 0.80 kg del pes corporal, mentre que un increment de la ingesta es va veure associat amb un augment del pes [56]. En canvi, una anàlisi de la base de dades de l'estudi NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) durant un període de més de 10 anys conclou que no hi ha indicis que el consum de begudes edulcorades estigui relacionat amb l'índex de massa corporal, un indicador d'obesitat [57].

Diferents estudis suggereixen que un dels mecanismes que relaciona la ingesta de begudes ensucrades amb l'increment de pes és la disminució de la sacietat i com a conseqüència una compensació incompleta de l'energia ingerida [32,58]. Així, si les calories d'un refresc s'afegeixen a una dieta típica, sense cap compensació per la càrrega addicional de calories, el consum d'un refresc per dia podria, en teoria, induir a guanyar fins a 2.25 kg/any [17].

La falta de compensació s'ha atribuït principalment als efectes de la fructosa sobre la insulina, la leptina i la grelina, tres hormones clau pel control de la ingesta. El fet que la fructosa estimuli la secreció d'insulina en menor mesura que la glucosa, condueix a una menor secreció de leptina que, al seu torn produeix una menor inhibició de la gana i com a conseqüència un increment en la ingesta [16,41]. A més, també s'ha demostrat que la glucosa redueix, molt més intensament que la fructosa, la producció de grelina, una hormona orexigènica [1]. Així, tots aquests fets explicarien perquè la fructosa és menys eficient que la glucosa en el control de la ingesta.

També és important destacar que la glucosa pot controlar directament la ingesta de menjar, ja que pot assolir el sistema nerviós central (CNS, *central nervous system*) a través de transportadors específics. En canvi, la fructosa no pot travessar fàcilment la barrera hematoencefàlica (BBB, *blood brain barrier*) a causa de la baixa presència de transportadors GLUT5 [6].

No obstant, es creu que l'increment de la ingesta calòrica no és l'únic responsable de promoure l'associació entre el consum de begudes edulcorades i el desenvolupament de l'obesitat, i que caldria explorar explicacions alternatives [55].

#### 1.4.2. Dislipèmia

Diferents estudis mostren que la ingesta de fructosa i de sacarosa produeix un increment dels nivells de triglicèrids en plasma. Aquest fet es podria deure principalment a dues raons: l'increment de la producció de triglicèrids i la disminució de la seva eliminació [1,32].

Tal i com s'ha descrit anteriorment, a causa del seu metabolisme, la fructosa és un sucre altament lipogènic. A més, s'ha observat que també pot activar els factors de transcripció SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein-1*) i ChREBP (*carbohydrate-responsive element-binding protein*) que incrementen l'expressió de gens involucrats en la lipogènesi *de novo* [36].

Per altra banda, també s'ha descrit que la fructosa podria causar hipertrigliceridèmia en un estat postprandial. Alguns autors suggereixen que aquesta alteració podria deure's a una reducció de l'eliminació dels triglicèrids plasmàtics [59].

En un estudi clínic molt complert, realitzat per Stanhope i col. [60] en el que es comparen els efectes de la ingesta de fructosa i glucosa durant 10 setmanes en pacients obesos o amb sobrepès, s'observa que tant la ingesta de fructosa com de glucosa incrementen els nivells de triglicèrids en dejú però que, en canvi, només la fructosa produeix hipertrigliceridèmia postprandial. A més, el consum de fructosa també indueix els marcadors hepàtics de lipogènesi *de novo* i alteracions en el metabolisme lipídic i en l'eliminació de lipoproteïnes.

Pel que fa als nivells de colesterol, hi ha alguns estudis que associen la ingesta de fructosa amb una reducció significativa del colesterol HDL (*high density lipoprotein*) i amb

l'increment dels nivells totals de colesterol [34,61]. En canvi, d'altres [62] no observen cap alteració en els nivells de colesterol total, HDL o LDL (*low density lipoprotein*), després de consumir fructosa.

A més d'alterar el perfil lipídic plasmàtic, la fructosa també pot induir a una deposició ectòpica dels lípids, és a dir, a l'emmagatzematge de triglicèrids en teixits diferents de l'adipós, com ara el múscul o el fetge. Aquesta deposició ectòpica està estretament relacionada amb el desenvolupament de resistència a la insulina en els teixits [63,64].

### **1.4.3. Resistència a la insulina**

Existeix una important evidència dels efectes perjudicials de la ingesta de sucres sobre la sensibilitat a la insulina i l'alteració de l'homeòstasi de la glucosa, especialment en aquells estudis que utilitzen models animals suplementats amb un alt contingut de fructosa [65,66].

Majoritàriament, s'ha descrit una resistència a la insulina a nivell hepàtic, però també s'ha observat en d'altres teixits. De fet, el nostre grup d'investigació recentment ha publicat un estudi en què es mostra com la ingesta líquida de fructosa, però no la de glucosa, en rates femella durant 8 setmanes altera no només els nivells plasmàtics d'insulina, sinó també la seva senyalització en el fetge, el múscul i el teixit adipós, els tres òrgans que principalment responen a la seva acció [8].

No obstant, en els estudis realitzats en humans hi ha més divergència en els resultats. Alguns estudis [67] demostren que tant el consum de fructosa com el de glucosa incrementen la resistència a la insulina; d'altres [60] que només la ingesta de fructosa produeix una alteració de la sensibilitat a la insulina; mentre que alguns no observen aquestes alteracions [68,69]. Aquestes discrepàncies es poden deure a la diferent durada de l'estudi, la quantitat de sucre ingerida i a les característiques dels participants.

Pel que fa als mecanismes que relacionen la fructosa amb el desenvolupament de la resistència a la insulina, s'han proposat diverses hipòtesis. Entre elles, destaquen la hipertrigliceridèmia, les alteracions en el metabolisme lipídic, la inflamació, l'estrès oxidatiu i les alteracions de la permeabilitat intestinal [1,70].

### **1.4.4. Alteracions en el fetge**

L'esteatosi hepàtica no-alcohòlica (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*) està descrita com una patologia del fetge que comprèn des de l'acumulació de lípids (esteatosi), l'esteatohepatitis, la cirrosi fins al carcinoma hepatocel·lular. L'esteatohepatitis, coneguda com a NASH (*non-alcoholic steatohepatitis*), es caracteritza per l'associació de l'acumulació de lípids amb la inflamació (hepatitis) i la fibrosi hepàtica [6,32].



El consum de sucres pot ser un factor que contribueixi al desenvolupament de NAFLD. Així, s'ha observat que la ingesta de fructosa incrementa la deposició de lípids al fetge en models animals i en humans [49,71,72]. A més, també s'ha associat amb l'aparició de fibrosi hepàtica. En l'estudi realitzat per Zhang i col. [73] es mostra com rates mascle alimentades amb una dieta rica en fructosa (32%) al cap de 4 setmanes desenvolupen esteatosi hepàtica, i que després de 8 setmanes de seguir aquesta dieta ja apareixen trets característics de NASH com ara inflamació i necrosi.

El nostre grup d'investigació [9], així com molts altres autors [74–76], apunta que l'increment de la deposició de lípids en el fetge es deu principalment a l'alteració de dues vies metabòliques: l'increment en la lipogènesi i la reducció de la  $\beta$ -oxidació hepàtica dels àcids grassos. Aquesta acumulació de triglicèrids pot induir l'estrès oxidatiu i l'expressió de citocines proinflamatòries que resultarà en la progressió del NAFLD al NASH.

#### **1.4.5. Alteracions en el teixit adipós**

En nombrosos casos s'ha descrit que la ingesta excessiva de sucres va acompanyada d'un increment del pes corporal i també del teixit adipós [77,78].

No obstant, s'han observat efectes diferencials entre la ingesta de glucosa i la de fructosa en el teixit adipós. Així, Stanhope i col. [60] van mostrar que el consum dels dos sucres durant 10 setmanes produïa un increment del pes i del teixit adipós, però, en canvi, només els subjectes que consumien glucosa presentaven un increment del teixit adipós subcutani, mentre que els que consumien fructosa ho feien del teixit adipós visceral. Cal destacar que l'increment de teixit adipós visceral s'ha relacionat més estretament amb l'aparició de malalties metabòliques comparada amb la del teixit adipós subcutani [79]. Aquests resultats són interessants ja que suggereixen que el consum de fructosa podria ser més perjudicial que el de glucosa.

Tot i així, no només és important la quantitat de teixit adipós sinó també la seva morfologia. L'estudi realitzat per Crescenzo i col. [80], per exemple, demostra que la ingesta de fructosa al 30% durant 8 setmanes en rates mascle produeix una hipertròfia en el teixit adipós visceral, incrementant significativament el volum dels adipòcits més grans i disminuint el dels més petits. Aquests canvis en la mida dels adipòcits s'associen amb una disminució de la sensibilitat a la insulina i com a conseqüència a una major activitat lipolítica.

Per altra banda, el teixit adipós també té un paper important com a òrgan endocrí, ja que regula l'homeòstasi energètica i secreta diferents hormones i citocines. L'adiponectina és l'hormona secretada amb més abundància pel teixit adipós i té un paper important en la regulació homeostàtica dels lípids i en l'acció de la insulina [81]. A més, també presenta efectes antiinflamatoris i antioxidants. En alguns estudis s'ha associat el consum de fructosa a una reducció dels nivells d'adiponectina, contribuint així a una resistència insulínica [82]. Pel que fa a la leptina, tot i que a curt termini no s'espera que la fructosa

estimuli la seva secreció, s'ha observat que un consum continuat de fructosa pot incrementar els nivells plasmàtics de leptina i alterar la seva senyalització, causant així un estat de resistència a la leptina [1,2,83]. També, hi ha estudis que mostren com el consum crònic de fructosa condueix a un estat inflamatori, a causa de l'increment dels nivells de citocines proinflamatòries, com ara TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) i IL (*interleukin*)-6, produïts pel teixit adipós. Aquests canvis inflamatoris poden agreujar el desenvolupament d'alteracions metabòliques [32,84].

### 1.4.6. Alteracions cardiovasculars

Un altre efecte perjudicial que s'ha detectat com a conseqüència del consum de sucres és l'aparició d'alteracions cardiovasculars. Així, en diversos estudis s'ha associat el consum de begudes edulcorades, i en especial el de fructosa, en humans amb el desenvolupament d'hipertensió [85,86] i de malalties coronàries [87].

Pel que fa als models animals, en un estudi [88], en el que s'analitzaven els efectes de la suplementació d'HFCS al 10% i al 20% sobre la funció vascular en rates mascle, van obtenir que el consum d'HFCS al 20% durant 10 setmanes no només produïa un increment de la pressió arterial, sinó també una disminució de la relaxació vascular a acetilcolina (Ach, *acetylcholine*) i un increment de la contracció en resposta a fenilefrina (PE, *phenylephrine*). A més, també s'observava un augment de l'estrès oxidatiu i un disminució de proteïnes vasoprotectors com SIRT1 (*silent information regulator 1*) i l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*). No obstant, en d'altres estudis no observen l'aparició d'hipertensió en rates malgrat administrar una dieta rica en fructosa (66%) [89].

Els processos pels quals la ingesta de sucres pot induir alteracions cardiovasculars són complexos. Per una banda, tal i com s'ha comentat anteriorment, un consum elevat de fructosa comporta un augment de pes, dislipèmia i l'aparició de resistència a la insulina. Tots aquests factors per si sols ja s'associen amb el desenvolupament d'alteracions cardiovasculars i per tant podrien explicar de forma indirecta la relació que presenten [1]. A més, hi ha una creixent evidència que la ingesta de sucres, i concretament la fructosa *per se* podria causar directament un increment de la pressió sanguínia [90].

Així, un dels mecanismes més acceptats entre les diferents hipòtesis és que el consum de fructosa augmenta els nivells d'àcid úric que, al seu torn, pot induir a una disfunció endotelial i a l'activació del sistema renina-angiotensina i, com a conseqüència, al desenvolupament d'hipertensió [11,45]. D'aquesta manera, diversos estudis, ja sigui en models animals [91] o en humans [85,92], han comprovat que al disminuir els nivells d'àcid úric, millora la funció endotelial i també es redueixen els valors de pressió arterial.

Per altra banda, un altre tret perjudicial de la fructosa és que és més susceptible que la glucosa a glicar proteïnes, un procés no enzimàtic en què els sucres s'uneixen a proteïnes donant lloc a la formació d'adductes anomenats AGEs (*advanced glycation end products*).

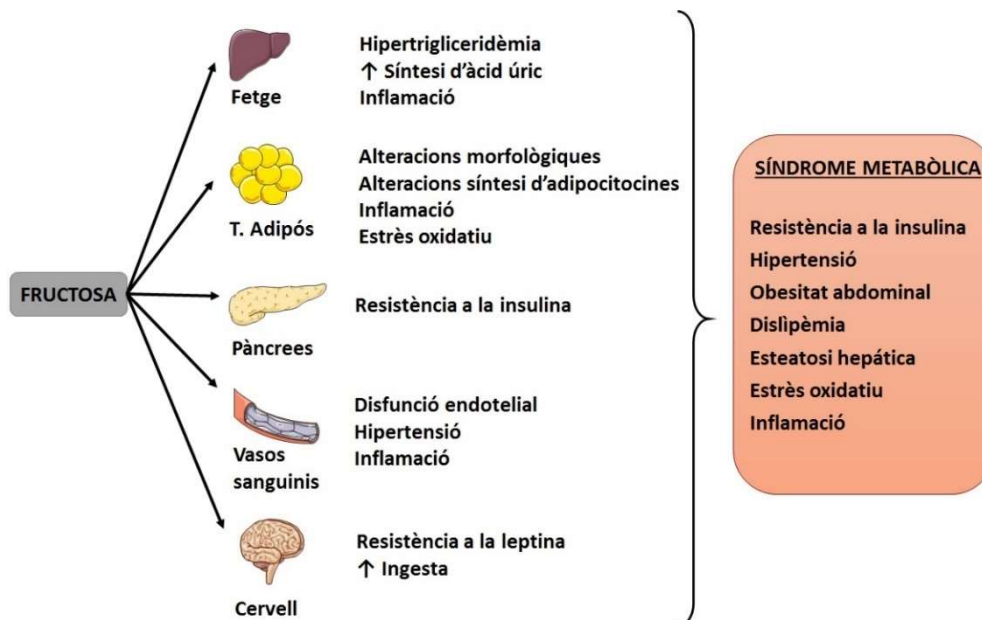
Aquests indueixen a l'estrès oxidatiu i a processos inflamatoris que juntament amb l'oxidació d'LDL poden promoure el desenvolupament d'arteriosclerosi i d'alteracions vasculares [16,90].

En aquest sentit, el nostre grup d'investigació va estudiar els efectes de la ingesta de fructosa líquida (15% p/v) combinada o no amb una dieta *Western* (una dieta rica en sucres i greixos) durant 3 mesos en ratolins deficientes en el receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (LDLR, *low density lipoprotein receptor*) (LDLR<sup>-/-</sup>). S'obtingué que, en condicions isocalòriques, només els animals suplementats amb fructosa i dieta *Western* presentaven un increment significatiu de l'àrea amb lesió ateroscleròtica en les aortes [93].

#### 1.4.7. Síndrome metabòlica

La síndrome metabòlica és un conjunt de patologies que inclou l'obesitat abdominal, la resistència a la insulina, la dislipèmia i la hipertensió, entre d'altres [32]. Diversos estudis evidencien una associació positiva entre el consum de begudes edulcorades i el risc a patir síndrome metabòlica [45,94,95].

De fet, totes les alteracions causades per la ingesta de sucres que han estat detallades fins ara (increment de pes, hipertrigliceridèmia, resistència a la insulina, esteatosi hepàtica, hiperuricèmia, inflamació, disfunció endotelial, etc...) poden promoure el desenvolupament de la síndrome metabòlica, ja sigui directament o indirectament [42,96]. A la Figura II-5 s'il·lustren els efectes que provoca la ingesta de fructosa en els diferents teixits i com convergeixen en promoure les patologies pròpies de la síndrome metabòlica.



**Figura II-5.** Efectes de la ingesta de fructosa en diversos òrgans que poden promoure el desenvolupament d'alteracions característiques de la síndrome metabòlica. Figura adaptada de Johnson i col. [42].

### **1.4.8. Diabetis mellitus**

Malgrat que en un inici es va pensar que la fructosa podria ser útil per a pacients diabètics a causa del seu baix GI i la manca d'estimulació insulínica, actualment hi ha una gran evidència que la ingesta excessiva de fructosa produeix resistència insulínica i, per tant, en cap cas seria recomanable per a pacients diabètics [43].

De fet, hi ha un gran nombre d'estudis epidemiològics i de meta-anàlisis que associen el consum de sucres amb el desenvolupament de la diabetis mellitus [97,98]. Com a exemple, un extens estudi [99] realitzat amb subjectes de diferents països d'Europa investigà l'associació entre el consum de begudes edulcorades i la incidència de diabetis mellitus tipus 2, i observà que hi havia una correlació positiva, independentment de l'índex de massa corporal.

A més, totes les patologies que caracteritzen la síndrome metabòlica són factors de risc per patir diabetis tipus 2. Així, no és estrany pensar que un consum continuat de begudes edulcorades podria estar relacionat amb el desenvolupament de la diabetis tipus 2. De fet, diversos estudis identifiquen diferents alteracions metabòliques causades pel consum de fructosa com a factors que contribueixen a patir diabetis [2,42].

També, cal esmentar que s'ha descrit que els efectes adversos de la ingesta de sucres poden ser fins i tot més perjudicials en pacients obesos o que pateixen malalties metabòliques que en individus sans [19]. Així, per exemple, Teff i col. [100] observaren que després de la ingesta de fructosa, però no de glucosa, pacients obesos presentaven un increment dels nivells de triglicèrids, suggerint que el consum de fructosa pot empitjorar les alteracions del perfil metabòlic de pacients obesos i, com a conseqüència, induir el desenvolupament d'altres malalties, com ara la diabetis tipus 2.

### **1.4.9. Alteracions cognitives**

Diversos estudis en models animals han demostrat que la ingesta de fructosa, ja sigui present en la sacarosa, HFCS, o bé per si sola, promou alteracions cognitives i demència. Per exemple, Ross i col. [101] van observar que rates mascle que havien ingerit un 60% de fructosa sòlida durant 5 mesos duien a terme un test espacial amb més dificultats que els controls, el que suggeria un defecte en la memòria espacial dependent de l'hipocamp. També, Molteni i col. [102] van relacionar el consum d'una dieta rica en greixos i sucres refinats durant 2 mesos en rates femella amb l'alteració en l'aprenentatge espacial i la reducció de neurotrofines importants per la senyalització de la plasticitat sinàptica i la neurogènesi.

Encara que no hi ha una evidència clara, diversos estudis apunten que aquestes alteracions cognitives podrien aparèixer principalment com a conseqüència d'una resistència insulínica a nivell central [2].

Pel que fa als humans, actualment hi ha pocs estudis que investiguin els efectes de la ingesta de fructosa en les funcions cognitives. Així, hi ha autors que exposen que manca literatura per poder afirmar que la fructosa sigui un factor de risc important pel desenvolupament de la demència en humans [4]. No obstant, recentment malalties com l'obesitat i la diabetis tipus 2 s'han relacionat amb el risc a patir malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer [103,104]. Així, sembla ser que, ja sigui directament o indirectament, la fructosa té un paper important en promoure alteracions cognitives i demència.

### 1.5. Estudis clínics i epidemiològics

Tal i com s'ha pogut observar fins ara, hi ha un elevat nombre d'estudis clínics i epidemiològics que investiguen els efectes del consum de sucres en humans. Alguns d'ells presenten resultats controvertits, probablement degut, en part, a la diversitat de fonts que aporten sucres a la dieta i a la dificultat d'estudiar-los de manera aïllada, sense considerar altres factors com ara l'estil de vida, l'exercici físic o la ingesta d'altres aliments [1].

A més, sovint és difícil discernir els efectes propis de cada monosacàrid, ja que habitualment es consumeixen en paral·lel. És el cas, per exemple, de les begudes edulcorades les quals contenen principalment sacarosa o HFCS, ambdós formats per la mescla de fructosa i glucosa. Tot i així, hi ha diferents estudis, principalment intervencionals, destinats a comparar l'efecte diferencial entre el consum de glucosa i el de fructosa [60,100].

Malgrat tot, sembla que hi ha una forta evidència que el consum de begudes edulcorades s'associa al desenvolupament de la síndrome metabòlica [11,45,105]. Així, per exemple, recentment s'ha investigat en la cohort de l'estudi PREDIMED (*PRevolución con Dieta MEDiterránea*), un llarg estudi conduït en diferents centres d'Espanya, l'associació entre la incidència de síndrome metabòlica i la ingesta de begudes ensucrades, begudes edulcorades artificialment i suc de fruita. Es va observar que el consum de més de 5 racions per setmana de tots els tipus de begudes analitzades es relacionava amb el risc a patir síndrome metabòlica. En canvi, pel que fa als suc de fruita, tan naturals com envasats, es va observar que el consum ocasional (1-5 racions/setmana) presentava una relació inversament proporcional amb el desenvolupament de síndrome metabòlica. Els autors suggereixen que a baixes dosis els components de la fruita podrien contrarestar els efectes perjudicials del sucre, però que, en canvi, el consum habitual de suc de fruita, per una banda, s'associaria a un estil de vida no saludable i per l'altra, el baix contingut en fibra podria conduir a una falta de compensació energètica, promovent així un excés de consum. Així doncs, el consum de suc de fruita sembla que indueixi menys la sacietat que la fruita sòlida [106].

Cal tenir present que la preocupació per la ingesta de fructosa no s'hauria de fer extensiu en aquella que es troba de forma natural en la fruita [16]. En primer lloc, perquè la ingesta de fructosa que prové de fonts naturals és relativament baixa. Als Estats Units, per exemple, només representa un 15% de la fructosa total ingerida [107]. En segon lloc, perquè aquests aliments contenen micronutrients, com ara substàncies antioxidants i polifenols, els quals poden contrarestar els efectes negatius de la fructosa [64]. I, en tercer lloc, perquè, tal i com s'ha comentat, l'alt contingut en fibra produeix una sensació de sacietat que permet regular el consum calòric.

Per altra banda, actualment està creixent el consum de begudes que contenen edulcorants sense calories com a substitutiu de les begudes ensucrades amb l'objectiu de disminuir la ingesta de sucres i conseqüentment de calories. En aquest sentit, diversos autors han investigat els efectes dels dos tipus de begudes. Tot i així, els resultats són controvertits i molts d'ells no són concloents [108]. És el cas de l'estudi realitzat per Ebbeling i col. [109] en el que adolescents obesos i amb sobrepès que regularment consumien begudes ensucrades es van dividir en un grup control i un grup experimental. El grup experimental va rebre begudes edulcorades artificialment durant 1 any d'intervenció, amb l'objectiu de reduir el consum de begudes ensucrades, seguit d'1 any de seguiment sense cap intervenció. S'observà que al cap d'1 any el grup experimental presentava un menor increment de pes que el control, però no al cap de 2 anys. Malgrat que aparentment sembla que les begudes sense calories podrien ser un bon substitutiu de les begudes que contenen sucre, cal realitzar molts més estudis que confirmin aquest fet i que investiguin d'una forma global els efectes que poden produir el consum de begudes edulcorades artificialment.

Finalment, s'aconsella substituir el consum de begudes edulcorades per altres alternatives més saludables, com per exemple l'aigua, com a estratègia per disminuir l'alta prevalença d'obesitat i de malalties metabòliques [44].

### **1.6. Models experimentals. Antecedents.**

La rata és un bon model per estudiar els efectes de la fructosa en humans. Això es deu principalment per dues raons. En primer lloc, perquè la rata, de la mateixa manera que els humans, no disposen de l'enzim glucosa-6-fosfatasa (G6P, *glucose-6-phosphatase*) en l'intestí. D'aquesta manera, durant l'absorció, a diferència d'alguns animals, com per exemple el ratolí, no és possible convertir part de la fructosa ingerida en glucosa [110]. En segon lloc, perquè l'administració de fructosa en rates indueix a unes alteracions metabòliques semblants a les que pateixen els humans amb síndrome metabòlica [5].

De fet, la rata suplementada amb altes quantitats de fructosa és un model de síndrome metabòlica àmpliament acceptat [111,112]. Durant varies dècades, el més utilitzat ha estat el que subministra dietes sòlides que contenen 50-60% de fructosa a rates, el qual s'ha observat que indueix a hipertensió, hipertrigliceridèmia, hiperinsulinèmia i resistència a la

insulina, entre d'altres. No obstant, l'ús d'aquest model per extrapolar els efectes en humans és controvertit, ja que les dosis administrades són molt altes i s'allunyen de les fisiològiques [11,113]. En canvi, les dietes que incorporen menors quantitats de sucre en l'aigua de beguda (10-20% p/v) mimetitzen el patró de consum humà i permeten una ingesta de fructosa equivalent a la del quartil superior de la població humana [6].

Durant els darrers anys, el nostre grup d'investigació s'ha centrat en l'estudi dels mecanismes moleculars pels quals la ingesta de fructosa causa alteracions metabòliques. Així, s'ha demostrat que el consum de fructosa al 10% (p/v) en l'aigua de beguda durant 14 dies en rates mascle produeix un increment de la lipogènesi hepàtica i una reducció de l'expressió i activitat del receptor PPAR $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* ) i, com a conseqüència, de la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos. En canvi, no promou un estat de resistència a la insulina, alteració observada en dietes sòlides amb alt contingut en fructosa [9,83,114].

Així mateix, es va voler determinar si els efectes que produïa el consum de fructosa eren causats pel seu propi metabolisme o bé per l'increment de l'aport energètic. Per a aquest objectiu, es va afegir un nou grup en el que s'administrà glucosa líquida també al 10% p/v durant 14 dies. Tot i que tant el grup fructosa com el glucosa van tenir el mateix consum calòric, només la fructosa produïa hipertrigliceridèmia i esteatosi hepàtica. Per tant, aquests resultats confirmaven que les alteracions metabòliques es devien exclusivament al consum de fructosa [9].

També es va observar que només la ingesta de fructosa líquida induïa hiperleptinèmia i un estat de resistència hepàtica a la leptina, fet que es va associar amb les alteracions observades en el catabolisme dels lípids [9,83].

Per altra banda, tenint en compte que la incidència de malalties cardiometabòliques en humans presenta diferències entre sexes, alguns estudis han investigat els efectes de la fructosa en funció del sexe. No obstant, hi ha força controvèrsia amb els resultats ja siguin en humans o en models animals. Alguns apunten que el sexe femení és més propens a desenvolupar alteracions metabòliques [115–117], mentre que d'altres suggereixen que els estrògens podrien tenir un paper protector en front a aquestes alteracions [62,118,119].

En aquest sentit, el nostre grup d'investigació va realitzar un estudi en el que es comparaven els efectes de la ingesta de fructosa líquida al 10% en rates mascle i femella durant 14 dies. Es va demostrar que en rates femella la fructosa, a diferència dels mascles, no induïa hiperleptinèmia, però, en canvi, provocava no només les mateixes alteracions descrites en els mascles (hipertrigliceridèmia, esteatosi hepàtica i disminució del catabolisme dels àcids grassos), sinó que també desenvolupava hiperglucèmia, hiperinsulinèmia i intolerància oral a la glucosa. Aquestes diferències es podrien deure a

## II. INTRODUCCIÓ

---

que la ingesta de fructosa indueix més fortament l'expressió hepàtica en femelles que en mascles de l'enzim FK, essencial en el control del metabolisme de la fructosa [120].

Així, aquestes alteracions en l'homeòstasi de la glucosa produïdes en rates femella es van associar a una reducció considerable de l'expressió hepàtica de l'IRS (*insulin receptor substrate*)-2, proteïna important en la via de senyalització de la insulina, i que, com a conseqüència, podria conduir a un estat de resistència a la insulina [120,121].

Tots aquests estudis investigaven els efectes del consum de fructosa líquida durant 14 dies, un període relativament curt si es considera que el patró de consum en humans es pot estendre durant anys. D'aquesta manera, el pròxim objectiu va ser esbrinar si aquests efectes es pronunciaven o bé s'atenuaven en un consum més prolongat. Així, s'utilitzà un període de 2 mesos, que seria comparable a una ingesta diària en humans durant 6 anys [122].

D'una banda, s'observà que la ingesta de fructosa al 10% durant 2 mesos també produïa esteatosi hepàtica, com a conseqüència d'un increment en la lipogènesi i una reducció del catabolisme d'àcids grassos. No obstant, mentre els mecanismes que explicaven aquestes alteracions en la suplementació de fructosa a curt termini involucraven la reducció dels nivells de PPAR $\alpha$ , en un període subcrònic s'apuntava a una inhibició de l'autofàgia [7].

Per l'altra banda, la ingesta de fructosa, però no la de glucosa, durant 2 mesos també produïa una intolerància a la glucosa i un defecte en la senyalització de la insulina en els teixits que principalment responen a l'acció de la insulina: el fetge, el teixit adipós i el múscul, indicant així una disminució de la sensibilitat a la insulina a nivell global [8].

La present tesi s'ha centrat en l'estudi de les alteracions metabòliques que produeix la ingesta de fructosa i glucosa en un període subcrònic i crònic, així com els efectes vasculars i cognitius. Per aquest motiu, a continuació s'explicarà detalladament els processos implicats en aquestes alteracions.



## 2. METABOLISME LIPÍDIC

En aquest apartat es detallaran diferents processos del metabolisme lipídic, com ara la síntesi i el catabolisme dels àcids grassos.

### 2.1. Síntesi d'àcids grassos i triglicèrids

La lipogènesi és el procés metabòlic que, a partir de compostos no lipídics, sintetitza àcids grassos per obtenir posteriorment triglicèrids. En el cas de la lipogènesi *de novo* aquests són sintetitzats a partir d'un excés de carbohidrats provinents de la dieta. Tot i que la major part dels triglicèrids que es troben en el plasma provenen de la dieta, la síntesi d'àcids grassos *de novo* també contribueix significativament al contingut lipídic del plasma, especialment, en aquells individus amb un consum elevat de carbohidrats [123,124]. El fetge i el teixit adipós són els principals teixits on es duu a terme la lipogènesi, sent la lipogènesi hepàtica quantitativament més eficient que la del teixit adipós [125].

Per sintetitzar àcids grassos *de novo*, es requereix que els carbohidrats proporcionin els àtoms de carboni necessaris a través de la seva metabolització. L'enzim L-PK (*liver-piruvate kinase*) permetrà la síntesi de piruvat, el qual serà transformat a citrat a través del cicle de Krebs. Gràcies a l'acció de l'enzim ACL (*ATP citrate lyase*), s'obtindrà l'acetil-CoA necessari per dur a terme la lipogènesi [126–128] (Figura II-6).

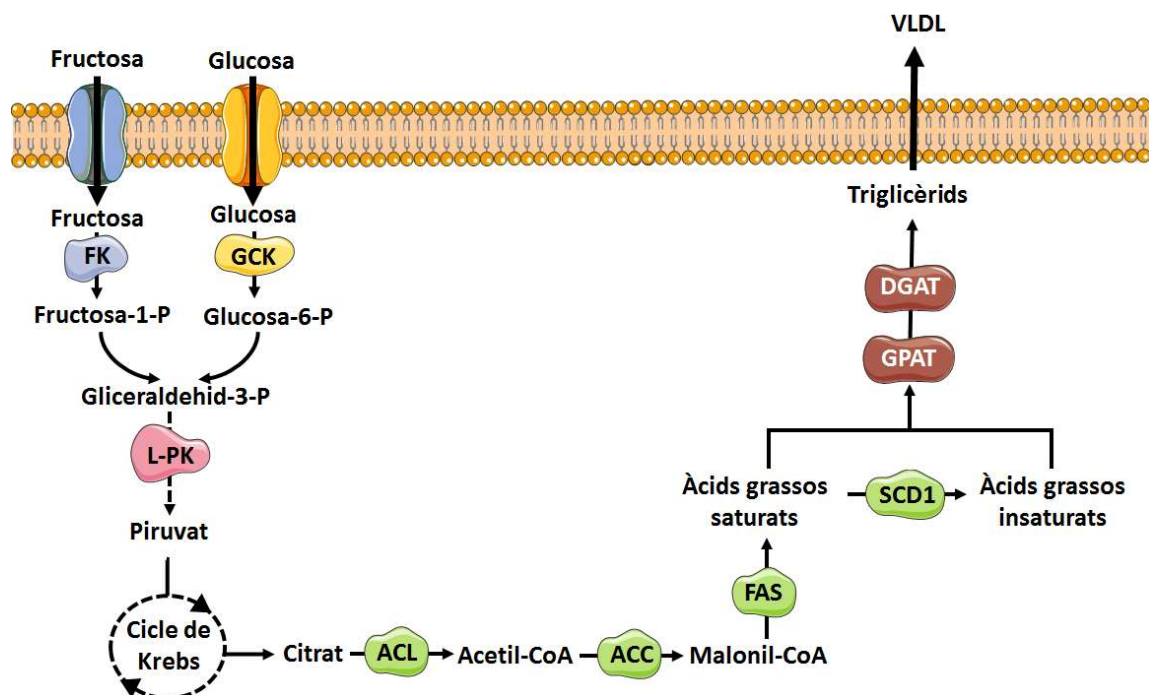


Figura II-6. Síntesi d'àcids grassos i triglicèrids.

En el citoplasma, l'acetil-CoA resultant es transforma en malonil-CoA per l'acció de l'enzim acetil-CoA carboxilasa (ACC, *acetyl-CoA carboxylase*). A continuació, a partir del malonil-

CoA, l'enzim FAS (*fatty acid synthase*) sintetitza àcids grassos saturats. El principal producte que s'obté és el palmitat, que serà el precursor d'altres àcids de cadena més llarga, com l'estearat [125,126]. El palmitat i l'estearat obtinguts en la lipogènesi poden utilitzar-se com a precursors de la síntesi d'àcids grassos insaturats a través de l'addició d'un doble enllaç per desaturases com l'estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD1, *stearoyl-CoA desaturase 1*) [124,127].

Els àcids grassos obtinguts s'esterificaran amb molècules de glicerol per donar lloc a triglicèrids. En aquest procés, destaquen l'enzim GPAT (*glycerol-3-phosphate acyltransferase*), que s'encarrega d'incorporar àcids grassos a la molècula de glicerol, obtenint diacilglicerol (DAG, *diacylglycerol*) com a producte, i el DGAT (*diacylglycerol acyltransferase*) que utilitzarà el DAG i un altre àcid gras com a substrats per la síntesi de triglicèrids [129].

### 2.1.1. Regulació de la síntesi d'àcids grassos i triglicèrids

La lipogènesi està estretament controlada per diversos factors, tan nutricionals com hormonals que regulen enzims involucrats en la síntesi d'àcids grassos i triglicèrids [130]. Aquests factors modulen l'activitat dels factors de transcripció SREBP-1 i ChREBP.

SREBP-1 i, concretament la isoforma SREBP-1c, és un factor de transcripció que exerceix un important control sobre la lipogènesi [130]. SREBP-1c es troba a la membrana del reticle endoplasmàtic (*ER, endoplasmic reticulum*) en forma de precursor. S'activa per acció de la insulina, la qual promou la realització d'un tall proteolític que permet a la forma madura entrar al nucli, on reconeix les seqüències SRE (*SREBP response element*) dels gens diana i promou la seva transcripció. Així, SREBP-1c regula l'expressió de diversos gens involucrats en la glucòlisi, com la G6P, en la síntesi d'àcids grassos, com FAS, ACC i SCD1, i en la de triglicèrids com GPAT [123,131].

Per altra banda, ChREBP és un factor de transcripció que s'activa en resposta als carbohidrats. Així, els carbohidrats faciliten la unió d'aquest factor a les regions ChoRE (*carbohydrate response element*) i indueix l'expressió de gens glucolítics com L-PK i lipogènics com ACC, FAS i SCD1 i GPAT [123,132].

A més, s'ha observat que ratolins transgènics que sobreexpressen SREBP-1c en el fetge desenvolupen esteatosi i incrementen els nivells d'mRNA de la majoria dels gens lipogènics [133], mentre que la deficiència de ChREBP produeix una disminució de la lipogènesi i la glucòlisi [132].

Així, SREBP-1c i ChREBP regulen coordinadament el metabolisme de la glucosa i la lipogènesi, unint-se a diferents elements de resposta i promovent que l'expressió i l'activitat dels enzims glucolítics i lipogènics sigui baixa en els períodes de dejú i s'incrementi en els períodes postprandials [127,133].

## 2.2. Transport i captació de triglicèrids

En el fetge, els triglicèrids obtinguts s'emmagatzemaran en els hepatòcits o bé s'empaquetaran en VLDL per ser secretats a la sang on arribaran als diferents teixits [131]. Els principals teixits que capten les VLDL són el múscul, que majoritàriament oxida els àcids grassos per obtenir energia, i el teixit adipós, que els emmagatzema en gotícules lipídiques intracel·lulars [126,134].

La síntesi de VLDL augmenta quan s'incrementen els nivells intrahepàtics d'àcids grassos no esterificats (NEFA, *non esterified fatty acids*) o bé quan s'allibera un excés de NEFAs per part del teixit adipós. Així, un increment de la síntesi de VLDL s'ha associat amb alteracions metabòliques com la resistència a la insulina, l'esteatosi hepàtica i l'obesitat visceral [135]. D'aquesta manera, mentre els quilomicrons són els encarregats de transportar els triglicèrids procedents de la dieta, les VLDL realitzen el transport dels lípids endògens [126].

Les VLDL estan formades per un nucli de triglicèrids, el qual està envoltat per fosfolípids, colesterol i diferents apolipoproteïnes (apo, *apolipoprotein*), com apo B-100, apo C-I, apo C-II, apo C-III i apo E [136]. Les Apo són reguladors importants del transport de lípids. A la taula II-1 es detallen les seves funcions metabòliques [126,137].

Apolipoproteïnes	Funcions metabòliques
Apo B-100	Necessària per la secreció de VLDL
Apo C-I	Inhibeix la unió de les lipoproteïnes als seus receptors
Apo C-II	Activa LPL
Apo C-III	Inhibeix LPL i incrementa la secreció de VLDL
Apo E	Desencadena l'eliminació de VLDL i quilomicrons residuals

**Taula II-1.** Funcions metabòliques de diferents apolipoproteïnes.

En el plasma, les VLDL es desplacen als capil·lars dels teixits extrahepàtics, on la lipoproteïna lipasa (LPL, *lipoprotein lipase*), activada per l'apo C-II, catalitza la hidròlisi dels triglicèrids a glicerol i NEFAs. La pèrdua de triglicèrids converteix part de les VLDL en les anomenades IDL (*intermediate-density lipoproteins*) que, al seu torn, donen lloc a les LDL, partícules que principalment transporten colesterol [138]. Els NEFAs alliberats com a resultat de l'acció de l'LPL són immediatament captats per les cèl·lules dels teixits mentre que les lipoproteïnes restants són captades pels receptors VLDLR (*very low density lipoprotein receptor*) i LDLR a través del reconeixement de l'apo B-100 [137] (Figura II-7).

Pel que fa a les lipoproteïnes residuals, és a dir, les que se'ls ha retirat part dels triglicèrids, són captades al fetge per un procés d'endocitosi facilitada per receptor gràcies a l'acció de VLDLR, LDLR i LRP (*LDL receptor-related proteins*), els principals receptors involucrats en l'aclariment de triglicèrids, ja que reconeixen l'apo E present en les lipoproteïnes residuals [139]. En aquest sentit, s'ha observat que la deficiència dels tres receptors indueix a un increment significatiu dels lípids plasmàtics comparats amb els ratolins *wildtype*, fet que

demostra la importància de la captació de lipoproteïnes residuals [140]. En un principi, es creia que els VLDLR no eren necessaris per l'aclariment de triglicèrids, ja que ratolins deficients de *Vldlr* presentaven una lipidèmia normal [141]. No obstant, diversos estudis han demostrat que la seva deficiència induïx a una acumulació dels lípids plasmàtics quan el metabolisme lipídic pateix un estrès, a causa, per exemple, d'una dieta rica en greixos [140,142].

A més, s'ha observat que tan l'LPL com l'HL (*hepatic lipase*), que hidrolitzen els triglicèrids en els teixits extrahepàtics i hepàtic respectivament, poden regular la captació hepàtica de les lipoproteïnes residuals. Així, per una banda, l'enzim HL hidrolitza els triglicèrids que romanen a les partícules IDL donant lloc a LDL [138]; per l'altra, s'ha demostrat que en absència dels tres principals receptors que reconeixen apo E, l'LPL és capaç de regular l'aclariment de lipoproteïnes [139].

També, cal destacar la importància de les proteïnes MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) i PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) en el metabolisme de les lipoproteïnes. MTP és necessària per l'ensamblatge i la secreció de les lipoproteïnes que contenen apo B-100, així com per la degradació d'apo B-100 [137,143]. Pel que fa a la PCSK9, s'ha demostrat que té un paper important en la degradació d'LDLR, fet que ha comportat un creixent interès en el desenvolupament d'inhibidors com a potencial estratègia terapèutica per reduir el risc cardiovascular [144].

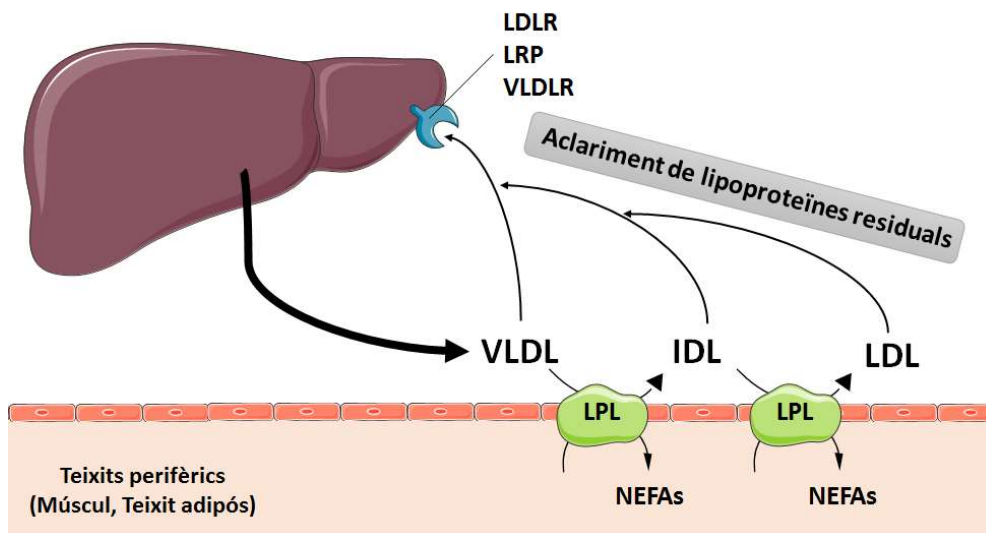


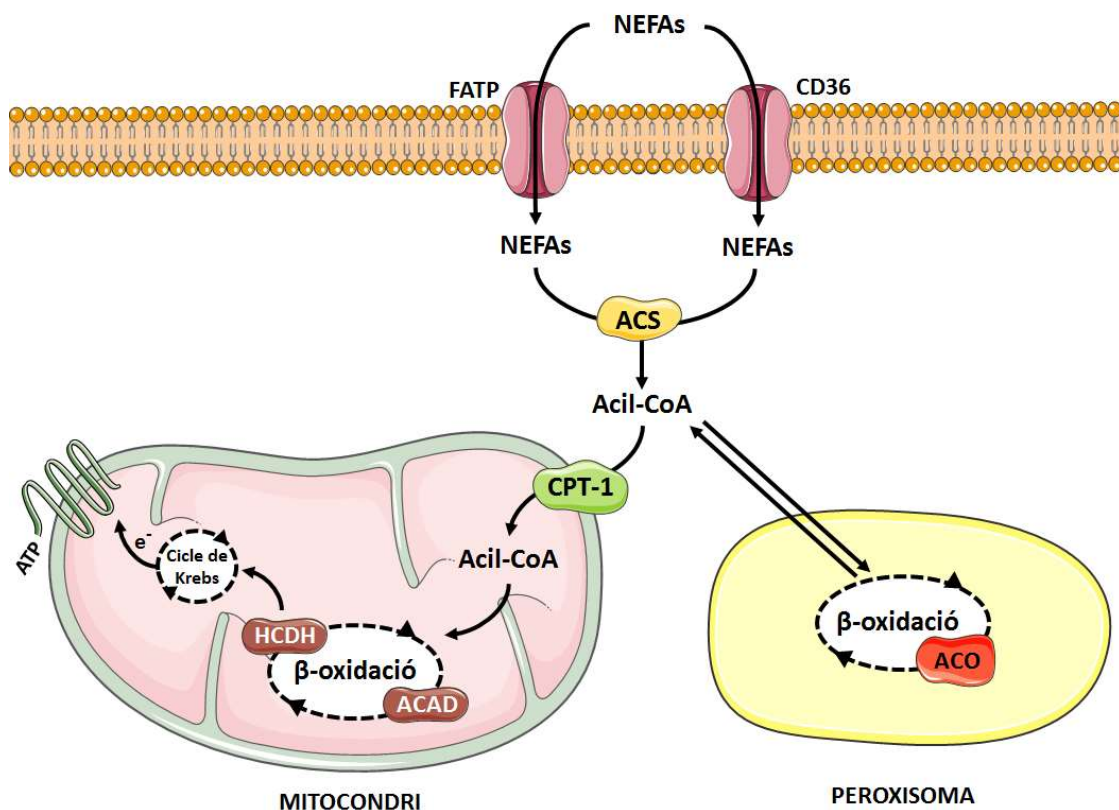
Figura II-7. Metabolisme de les lipoproteïnes.

### 2.3. Catabolisme dels àcids grassos: $\beta$ -oxidació

El catabolisme dels àcids grassos engloba una sèrie de processos que tenen per objectiu l'obtenció d'energia a partir de la degradació de les molècules d'àcids grassos. La majoria es metabolitzen pel procés de la  $\beta$ -oxidació, el qual representa la principal font d'energia en diversos teixits, entre els que s'inclouen el fetge, el múscul i el cor [145].

En primer lloc, per a que es dugui a terme la  $\beta$ -oxidació, és necessària l'entrada d'àcids grassos del plasma a l'interior de la cèl·lula. Això es produeix gràcies a la proteïna d'unió a àcids grassos (FABP, *fatty acid binding protein*) i als transportadors d'àcids grassos CD36 (*fatty acid translocase*) i FATP (*fatty acid transport protein*) [146,147] (Figura II-8).

Una vegada dins la cèl·lula, l'enzim ACS (*acyl-CoA synthase*) afegeix un grup CoA als àcids grassos, permetent la seva activació i obtenint els seus derivats acil-CoA. A continuació, l'enzim CPT-1 (*carnitine palmitoyltransferase 1*) promou la translocació dels derivats d'acil-CoA al mitocondri per a que es pugui dur a terme la  $\beta$ -oxidació [127,147]. En els humans, s'han identificat tres isoformes de CPT-1: CPT-1A, CPT-1B i CPT-1C que predominen al fetge, múscul i cervell, respectivament [148].



**Figura II-8.**  $\beta$ -oxidació mitocondrial i peroxisòmica dels àcids grassos

A la  $\beta$ -oxidació mitocondrial, els àcids grassos experimenten l'eliminació oxidativa d'unitats successives de dos àtoms de carboni, proporcionant així molècules d'acetil-CoA. Destaca el paper de les acil-CoA deshidrogenases (ACAD, *acyl-CoA dehydrogenases*), que catalitzen el primer pas d'aquest procés, així com de l'enzim HCDH (*hydroxacyl-coenzyme A dehydrogenase*) que produeix molècules de NADH [145,149]. Aquests acetil-CoA poden condensar-se en cossos cetònics per utilitzar-se com a font d'energia en teixits extrahepàtics, o bé oxidar-se a  $\text{CO}_2$  a través del cicle de Krebs donant lloc als transportadors electrònics reduïts NADH i  $\text{FADH}_2$ , i finalment a ATP a través de la cadena transportadora d'electrons [126,147].

Tot i que la  $\beta$ -oxidació té lloc majoritàriament en els mitocondris, també es duu a terme en d'altres compartiments cel·lulars com els peroxisomes. La  $\beta$ -oxidació peroxisòmica és important per l'oxidació d'àcids grassos de cadena molt llarga i ramificats, que posteriorment seran oxidats completament en el mitocondri. Destaca, l'enzim conegut com a ACO (*acyl-CoA oxidase*), que catalitza l'etapa limitant del procés de  $\beta$ -oxidació peroxisòmica [126,150].

### 2.3.1. Regulació de la $\beta$ -oxidació

La  $\beta$ -oxidació està fortament regulada per diversos factors com ara la disponibilitat d'àcids grassos, la demanda energètica, el control transcripcional dels enzims implicats i el control al·lostèric. Així, la seva activitat incrementa en els períodes de dejú i d'alta demanda energètica, mentre que disminueix en els períodes postprandials [147].

Un dels principals reguladors de la  $\beta$ -oxidació és el factor de transcripció PPAR $\alpha$  que promou l'activació de la  $\beta$ -oxidació tan mitocondrial com peroxisòmica [127]. Pertany a la família dels receptors nuclears dels PPAR, els quals es caracteritzen per formar un heterodímer amb els receptors X de retinoides (RXR, *retinoid-X receptor*) i unir-se a la regió promotora dels seus gens diana, coneguda com a PPRE (*peroxisome proliferator response element*), per modular-ne la seva transcripció [150]. La importància de PPAR $\alpha$  recau en el fet que regula molts dels gens que participen en la  $\beta$ -oxidació. En destaquen les proteïnes FABP i CD36, que permeten l'entrada d'àcids grassos a la cèl·lula, i ACS, CPT-1 i ACO, enzims claus en la  $\beta$ -oxidació mitocondrial i peroxisòmica [149].

A més, s'han identificat diversos coactivadors de PPAR $\alpha$  que poden promoure la  $\beta$ -oxidació com ara els àcids grassos de cadena llarga i PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  coactivator 1*) [127].

PGC-1 $\alpha$  és un dels coactivadors més ben caracteritzats de PPAR $\alpha$ . S'ha observat que en dejú, SIRT1, una proteïna dependent del cofactor NAD<sup>+</sup> amb activitat desacetilasa, desacetila PGC-1 $\alpha$  i incrementa la seva activitat [151]. En canvi, en un estat postprandial, la insulina promou la fosforilació de PGC-1 $\alpha$ , fet que impedeix l'estimulació de la  $\beta$ -oxidació per part de PGC-1 $\alpha$  [127]. De fet, estudis previs en el nostre grup [10] van observar que el consum de fructosa durant 14 dies en rates femella produïa una disminució dels nivells de SIRT1 en el fetge, que comportava un increment en l'acetilació de PGC-1 $\alpha$  i, com a conseqüència, una disminució de l'activitat PPAR $\alpha$  i de la  $\beta$ -oxidació. També, s'ha observat que SIRT1 pot interaccionar directament amb PPAR $\alpha$  i promoure la seva activitat transcripcional [151].

Per altra banda, la  $\beta$ -oxidació també es regula de forma al·lostèrica. S'ha demostrat que el malonil-CoA, un intermediari de la síntesi d'àcids grassos, inhibeix l'enzim CPT-1, impeding l'entrada dels àcids grassos en la mitocòndria i, per tant, bloquejant la seva degradació quan la síntesi està induïda. La quantitat de malonil-CoA present a la cèl·lula depèn

principalment de l'activitat de l'enzim ACC que catalitza la formació de malonil-CoA a partir d'acetil-CoA [126,148]. També, l'enzim malonil-CoA decarboxilasa (MCD, *malonyl-CoA decarboxylase*), regulat per PPAR $\alpha$ , té un paper important en la regulació dels nivells de malonil-CoA, ja que s'encarrega de transformar molècules de malonil en acetil-CoA [147]. Així, nivells elevats de malonil-CoA poden promoure l'acumulació cel·lular de lípids [152].

## 2.4. Lipòlisi

Els àcids grassos s'emmagatzemen en forma de triglicèrids a totes les cèl·lules, però principalment al teixit adipós. En resposta a una necessitat energètica, els triglicèrids són hidrolitzats i mobilitzats per a que puguin ser utilitzats pels teixits perifèrics [153].

La lipòlisi és el procés pel qual els triglicèrids són degradats gradualment a tres molècules de NEFAs i una de glicerol gràcies a l'acció de les lipases ATGL (*adipose triglyceride lipase*), HSL (*hormone-sensitive lipase*) i MGL (*monoacylglycerol lipase*). Així, en primer lloc, els triglicèrids són hidrolitzats per l'enzim ATGL que allibera NEFAs i DAG. El DAG produït és posteriorment hidrolitzat per HSL per alliberar NEFAs i monoacilglicerol (MAG, *monoacylglycerol*). Finalment, MAG és completament hidrolitzat per la MGL per generar glicerol i NEFAs. Els NEFAs i el glicerol seran alliberats a la circulació on podran ser captats pels teixits perifèrics [154].

Inicialment, es considerava que HSL era la principal lipasa del teixit adipós. No obstant, Osuga i col. [155] van observar que ratolins deficientes en HSL no eren obesos ni acumulaven triglicèrids. En canvi, sí que emmagatzemaven grans quantitats de DAG [156], fet que mostrava l'especificitat d'HSL per la hidròlisi de DAG i també indicava l'existència d'una altra lipasa. Aquesta lipasa va resultar ser ATGL, que actualment és considerada clau en la lipòlisi [154,157].

Tot i que HSL és més específica per la hidròlisi de DAG, també pot hidrolitzar triglicèrids i MAG amb una menor eficiència [154]. Així, per exemple, animals deficientes en MGL no desenvolupen resistència a la insulina, indicant que HSL pot revertir parcialment la reducció de l'activitat de MGL [158]. De fet, ATGL i HSL són les lipases quantitativament més importants, ja que són les responsables d'un 95% de la hidròlisi dels triglicèrids [154]

### 2.4.1. Regulació de la lipòlisi

La lipòlisi està estretament regulada per hormones. Per una banda, les catecolamines i el glucagó estimulen l'alliberament d'àcids grassos dels triglicèrids emmagatzemats; mentre que per l'altra, la insulina contraresta l'acció d'aquestes hormones, induïnt a l'emmagatzematge de les reserves lipídiques [157].

Als períodes d'alta demanda energètica, com ara el dejú i l'exercici, les catecolamines, com l'epinefrina o la norepinefrina, i el glucagó s'uneixen als seus receptors (receptors  $\beta$ -

## II. INTRODUCCIÓ

adrenèrgics i receptor de glucagó, respectivament) que a través de proteïnes G acoblades, activen l'enzim adenilat ciclase (AC, *adenylate cyclase*). Aquest incrementa els nivells intracel·lulars d'AMPc i, conseqüentment, activa la proteïna cinasa A (PKA, *cAMP-dependent protein kinase*). PKA promou la fosforilació de l'enzim HSL i de la perilipina-1 (PLIN-1, *perilipin-1*) [159,160]. Un cop fosforilat, HSL transloca del citosol cap a l'interior de la gotícula lipídica, activant així, el procés de lipòlisi. Respecte la PLIN-1, una proteïna que està associada a la gotícula lipídica, la seva fosforilació induïx a canvis en la posició dels seus components que faciliten la hidròlisi dels triglicèrids per part de les lipases [154,157] (Figura II-9).

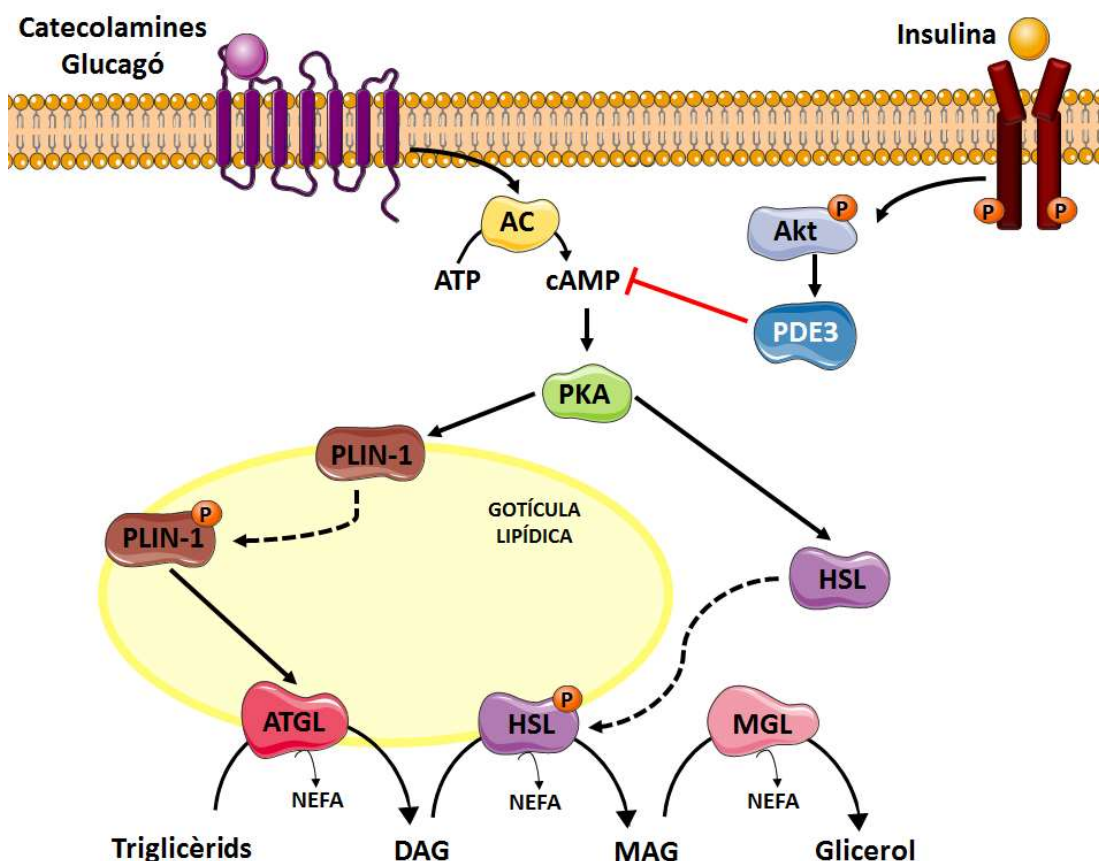


Figura II-9. Mecanismes de regulació del procés de la lipòlisi.

La regulació d'ATGL es diferencia de la d'HSL en diversos aspectes. En primer lloc, ATGL es localitza en la gotícula lipídica i, per tant, la seva activació no requereix una translocació [157]. En segon lloc, l'activació d'ATGL no sembla ser regulada directament per PKA, sinó a través de la fosforilació de la PLIN-1 [154,159,161]. Pel que fa a l'MGL, la seva expressió és abundant i aparentment no està regulada hormonalment [153,157].

Per altra banda, la insulina, alliberada en períodes postprandials, és l'hormona amb més capacitat antilipolítica. Així, a través de l'activació d'Akt (procés que es detallarà més endavant), activa la PDE (*phosphodiesterase*) 3B que redueix els nivells d'AMPc i conseqüentment l'activitat de PKA. Això produeix una disminució de la fosforilació d'HSL i



de la PLIN-1 i per tant una reducció de l'activació i translocació d'HSL i de l'activació d'ATGL [157]. A més, la insulina també pot inhibir la lipòlisi a través de l'activació de la PP1 (*protein phosphatase 1*), la qual ràpidament defosforila i desactiva HSL [157,160].

La principal conseqüència d'una reducció de l'activitat lipolítica és l'acumulació massiva de triglicèrids en els adipòcits i en altres teixits, afavorint el desenvolupament de l'obesitat [154]. Per al contrari, una activitat lipolítica excessiva indueix a un increment dels nivells de NEFAs en el plasma i a una deposició ectòpica dels triglicèrids, que contribueixen al desenvolupament de la resistència a la insulina i a la lipotoxicitat [157,160]. Per això, la regulació de la lipòlisi és crucial pel manteniment de l'homeòstasi energètica i per la prevenció de malalties metabòliques.

### 3. HOMEÒSTASI ENERGÈTICA

Pel bon funcionament de l'organisme és crucial que es mantingui un equilibri en el balanç energètic. Nombrosos factors, tan centrals com perifèrics, intervenen en el control de l'homeòstasi energètica. La insulina, la leptina i l'adiponectina són hormones amb un paper destacat en la regulació del metabolisme energètic. A continuació, es detallaran les seves accions principals i els mecanismes implicats.

#### 3.1. Insulina

La insulina és una hormona anabòlica produïda i secretada per les cèl·lules  $\beta$  dels illots de Langerhans del pàncrees en resposta a un augment de la glucèmia. Està formada per dues cadenes polipeptídiques unides per ponts disulfur. La seva acció és essencial pel desenvolupament, el creixement i el manteniment de la homeòstasi energètica [162].

Així, després de la ingesta, la insulina afavoreix la captació, utilització i emmagatzematge de glucosa, aminoàcids i lípids, a la vegada que inhibeix processos catabòlics com la degradació de glucogen, greixos i proteïnes [163]. No obstant, exerceix unes accions específiques en cada òrgan. A continuació, s'exposen els principals efectes d'aquesta hormona en diferents teixits.

- En el fetge, la insulina promou la síntesi de glucogen i inhibeix la producció hepàtica de glucosa, a través de la supressió dels enzims gluconeogènics. A més, també promou l'augment de la síntesi d'àcids grassos, incrementant la lipogènesi [162,164].
- En el múscul, promou la captació de glucosa, la síntesi de glucogen i la utilització i emmagatzematge de lípids. Cal remarcar que el múscul esquelètic és un teixit clau en la regulació de la homeòstasi energètica, ja que metabolitza i capta un 60-70% de la glucosa plasmàtica en resposta a l'estimulació per insulina. Per altra banda, la insulina també indueix la síntesi de proteïnes al múscul [164,165].
- Pel que fa al teixit adipós, la insulina estimula la captació de glucosa per part dels adipòcits, tot i que utilitza una menor part de la glucosa perifèrica (<10%) que el múscul [164]. La principal funció de la insulina en el teixit adipós és l'activació de la lipogènesi i la disminució de la lipòlisi. D'aquesta manera, es produeix un increment de les reserves energètiques en forma de greixos i es disminueix l'alliberació de NEFAs, del teixit adipós cap al plasma [162,165].

- En el cervell, s'ha observat que la senyalització de la insulina és essencial en la regulació de diverses activitats neuronals com ara la ingesta de menjar, la despesa energètica, el metabolisme perifèric i també l'aprenentatge i la memòria. Així, la insulina regula la secreció de diverses hormones com ara la leptina i la grelina, que juntament amb la senyalització d'altres molècules, permeten controlar el balanç energètic de tot l'organisme [166,167].
- En els vasos sanguinis, la insulina indueix la vasodilatació de les cèl·lules endotelials a través de l'activació de la producció d'òxid nítric [168].

A la Figura II-10 es poden veure esquematitzades les principals accions de la insulina en els diferents òrgans citats.

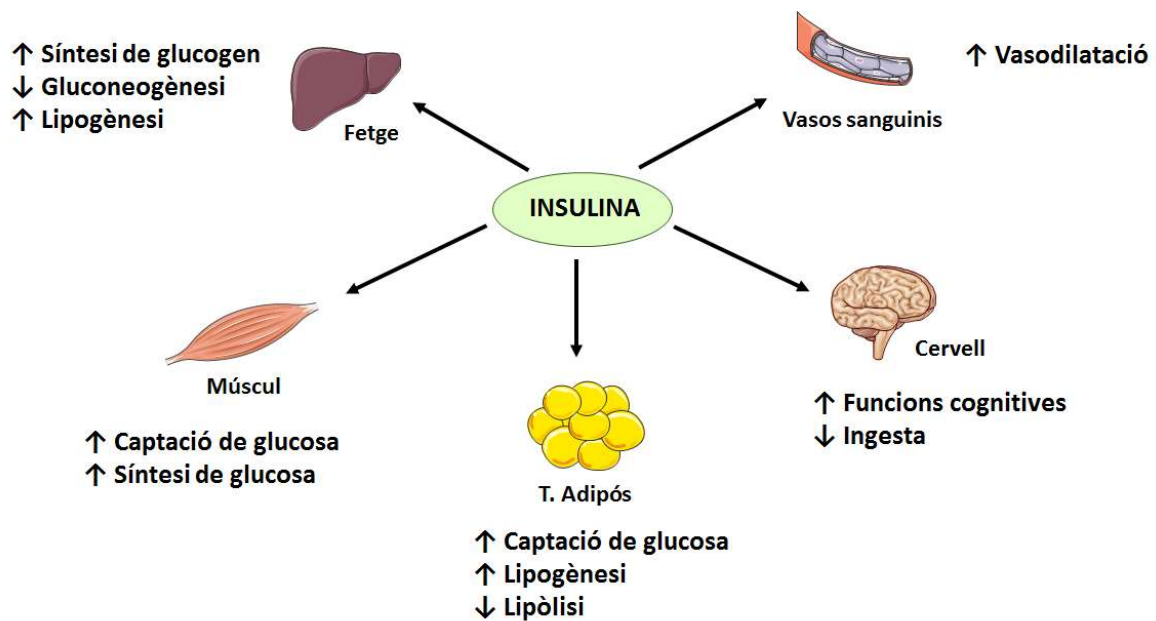


Figura II-10. Accions de la insulina en diferents teixits.

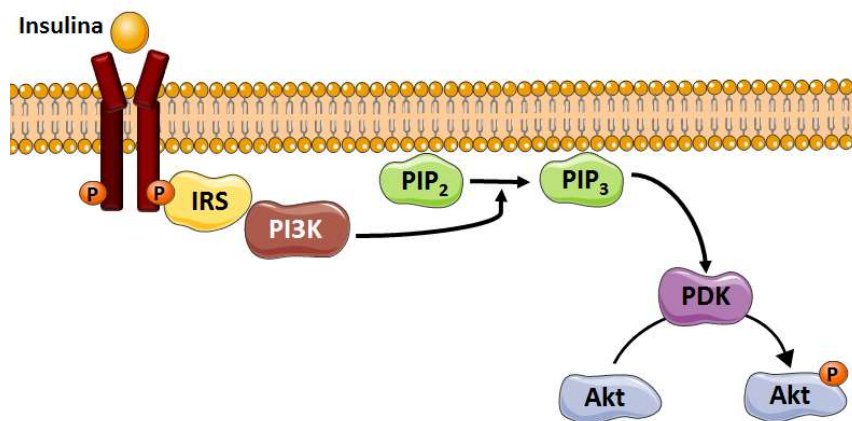
### 3.1.1. Via de senyalització de la insulina. Via PI3K-Akt.

La insulina exerceix les seves funcions a través de la unió al seu receptor. El receptor de la insulina (IR, *insulin receptor*) és una proteïna de membrana heterotetramèrica, formada per dues subunitats  $\alpha$ , situades a la part externa de la membrana plasmàtica, i dues subunitats  $\beta$  transmembrana. La insulina s'uneix a les subunitats  $\alpha$  i provoca un canvi conformacional que condueix a l'activació de les subunitats  $\beta$ . D'aquesta manera, es produeix una reacció d'autofosforilació on les subunitats  $\beta$  fosforilen residus tirosina de la subunitat  $\beta$  adjacent. Aquesta autofosforilació de l'IR estimula l'activitat catalítica del propi receptor, que fosforila residus tirosina de substrats intracel·lulars, com ara IRS o Gab-1 (*Grb2-associated-binding protein 1*) [126,163]. Hi ha diferents proteïnes IRS, sent les més importants en la regulació del metabolisme glucídic IRS-1 i IRS-2. IRS-1 és la isoforma més

## II. INTRODUCCIÓ

abundant en el múscul esquelètic i el teixit adipós, mentre que IRS-2 predomina en el fetge [169,170] (Figura II-11).

En aquest punt, la senyalització de la insulina pot seguir dues vies principals: la ruta PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*), associada a la majoria de les respostes metabòliques de la insulina, o bé la ruta de les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), responsable dels efectes de creixement, proliferació i diferenciació cel·lular [164,171]. A continuació, degut a la seva rellevància en la present tesi, es descriurà únicament la ruta PI3K.



**Figura II-11.** Senyalització de la insulina. Via PI3K.

La proteïna PI3K és un dímer, format per una subunitat reguladora (p85) i una subunitat catalítica (p110), que es troba en el citosol de la cèl·lula. Quan la insulina activa les proteïnes IRS, aquestes s'associen a la subunitat p85 a través del domini SH2 (*Src homology 2*). Això provoca el transport de la subunitat p110 cap a la membrana plasmàtica on catalitzarà la formació de PIP<sub>3</sub> (*phosphatidylinositol triphosphate*) a partir de PIP<sub>2</sub> (*phosphatidylinositol biphosphate*). PIP<sub>3</sub> estimula l'activitat de PDK1 (*3'-phosphoinositide-dependent kinase 1*) que, al seu torn, fosforila i activa diverses cinases, entre les que destaca la proteïna cinasa B, també coneguda com a Akt (*v-Akt thymoma viral oncogene homolog*) [126,163]. La fosforilació dels dos principals llocs reguladors, Thr<sup>308</sup> i Ser<sup>473</sup> són essencials per una completa activació de la proteïna Akt [170].

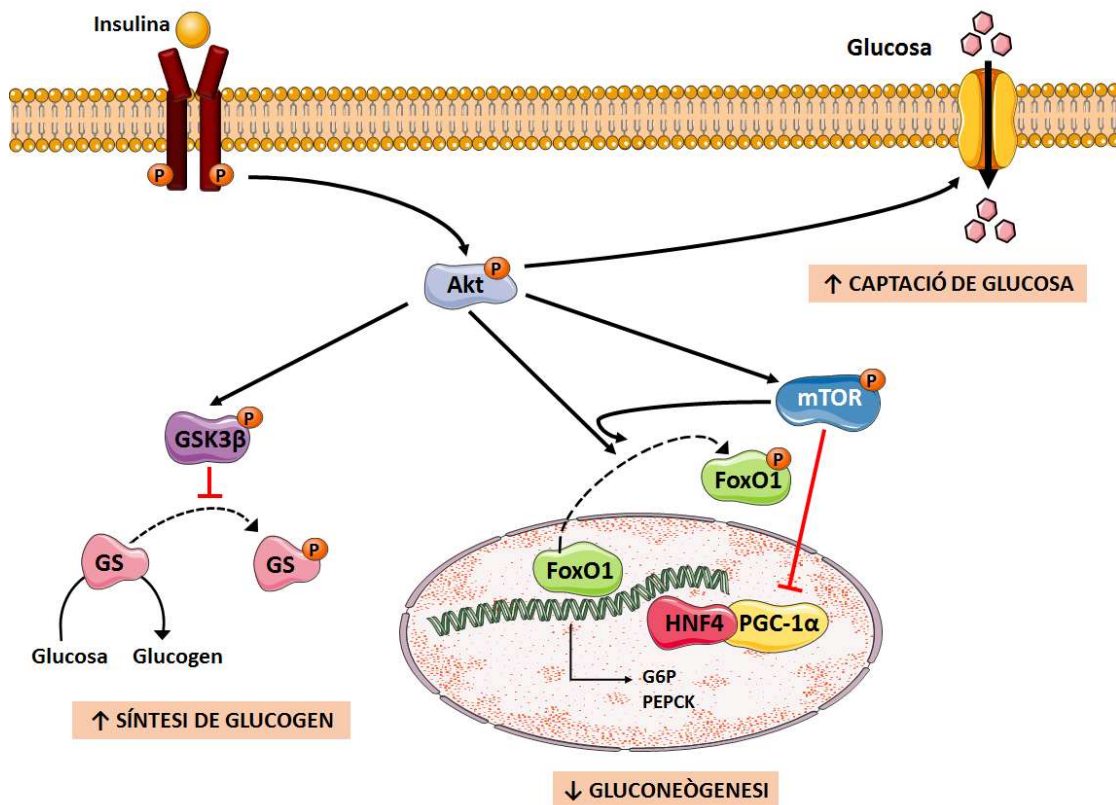
La proteïna Akt té una gran importància en la regulació de la homeòstasi energètica, ja que tal i com quedarà palès en els següents apartats intervé en nombroses accions de la insulina, a través de la fosforilació i regulació de diverses molècules.

### 3.1.2. Insulina i homeòstasi de la glucosa

La insulina té un paper molt important en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa. Així, a través de l'activació d'Akt, promou la translocació intracel·lular del transportador GLUT4 cap a la membrana plasmàtica, facilitant la captació de glucosa, principalment per part del múscul i del teixit adipós. També, l'activació d'Akt comporta la fosforilació en residus serina

o treonina de diverses proteïnes diana com ara la cinasa de la glucogen sintasa (GSK3 $\beta$ , *glycogen synthase kinase 3  $\beta$* ) i la proteïna FoxO1 (*Forkhead box protein O1*), importants en els processos de gluconeogènesi i de síntesi de glucogen [170] (Figura II-12).

GSK3 $\beta$  és un enzim clau en la regulació de la síntesi de glucogen. En condicions basals, la seva forma activa, no fosforilada, fosforila la glucogen sintasa (GS, *glycogen synthase*). Això produeix la seva inactivació i contribueix, d'aquesta manera, a la disminució de la síntesi de glucogen. Quan Akt fosforila GSK3 $\beta$  en els residus serina (Ser<sup>9</sup>) promou la seva inactivació i, en conseqüència, augmenta l'activitat de l'enzim GS i la síntesi de glucogen [171,172].



**Figura II-12.** Mecanismes de regulació de l'homeòstasi de la glucosa induïts per la insulina.

Per altra banda, FoxO1 és un factor de transcripció que activa l'expressió de diversos gens, entre els que destaquen els enzims implicats en el procés de la gluconeogènesi hepàtica com G6P i fosfoenolpiruvat carboxicinas (PEPCK, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*). La insulina, a través de l'activació d'Akt, promou la fosforilació de FoxO1 en la posició Ser<sup>256</sup> i indueix a una inactivació del factor de transcripció. La fosforilació produeix la seva retenció en el citosol, impedit que exerceixi la seva funció en el nucli [173]. En aquest sentit, s'ha demostrat que la supressió dels gens IRS-1 i IRS-2 en el fetge de ratolins, impedeix l'acció d'Akt sobre FoxO1, resultant en un desenvolupament de hiperglucèmia, hiperinsulinèmia, resistència a la insulina [174].

## II. INTRODUCCIÓ

---

Per al contrari, en una situació de dejú, el glucagó secretat, a través de la senyalització cAMP/PKA promou la fosforilació de PKA que indueix a l'activació de CREB (*cAMP response element binding protein*), un factor de transcripció que també estimula la gluconeogènesi hepàtica [127,175]. CREB també regula l'activació de PGC-1 $\alpha$ , que al seu torn, indueix la transcripció de gens gluconeogènics mitjançant l'activació d'HNF4 (*hepatic nuclear factor 4*) i de FoxO1. A més, s'ha observat que SIRT1 indueix la desacetilació i, per tant, l'activació de PGC-1 $\alpha$  i FoxO1 promovent la gluconeogènesi [127,163]. Cal destacar que l'activitat de SIRT1 és dependent de la quantitat de NAD<sup>+</sup>, coenzim sintetitzat gràcies a la proteïna NAMPT (*nicotinamide phosphoribosyltransferase*) [176].

Per altra banda, Akt també pot fosforilar i inhibir TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*), permetent l'activació d'mTOR (*mammalian target of rapamycin*) [177]. mTOR és una serina/treonina cinasa que, juntament amb SIRT1 i AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*), es considera un sensor d'energia. No obstant, mentre SIRT1 i AMPK s'associen als estats de baixa energia, com per exemple el dejú, mTOR s'associa amb els estats d'alta energia. mTOR té un paper molt important en el creixement, la proliferació cel·lular i la síntesi de proteïnes però també regula la gluconeogènesi, ja que s'ha descrit que pot fosforilar tant PGC-1 $\alpha$  com FoxO1, promovent així la seva inhibició [127,178].

Així, en conjunt, s'observa que l'activació d'Akt és clau en la regulació de la homeòstasi de la glucosa. De fet, s'ha descrit que ratolins deficients d'Akt exhibeixen una síndrome prediabètica, ja que, a part d'hiperglucèmia, també presenten una reducció significativa de la captació de glucosa al múscul i al teixit adipós i una falta de regulació de la gluconeogènesi al fetge [179,180].

### 3.1.3. Insulina i homeòstasi lipídica

La insulina, de manera similiar al metabolisme glucídic, promou la síntesi de lípids i inhibeix la seva degradació.

L'efecte de la insulina sobre la lipogènesi està principalment controlat pel factor de transcripció SREBP-1c. La insulina, a través de la via PI3K/Akt, activa SREBP-1c i facilita la seva exportació de l'ER al nucli, on estimula la transcripció d'enzims involucrats en la glucòlisi i en la lipogènesi [125]. A més, s'ha descobert que Akt, a través de l'estimulació d'mTOR, promou l'activació d'SREBP-1c [181,182] (Figura II-13).

Akt promou també l'augment de la disponibilitat de precursors per la síntesi de lípids a l'estimular la captació de glucosa, així com alguns enzims que participen en el procés de la glucòlisi, com la GCK [127,181].

A més, la insulina augmenta la formació de lipoproteïnes VLDL en el fetge, a la vegada que estimula l'activitat de l'LPL, incrementant la captació de triglicèrids de la circulació sanguínia als teixits perifèrics com el múscul i el teixit adipós [165,183].

Per altra banda, tal i com s'ha detallat anteriorment, la insulina redueix la capacitat lipolítica del teixit adipós a través de la reducció de l'activitat de PKA i conseqüentment d'HSL, disminuint així els nivells de NEFAs en el plasma. A més, la insulina també redueix la  $\beta$ -oxidació en el múscul i en el fetge [160,163].

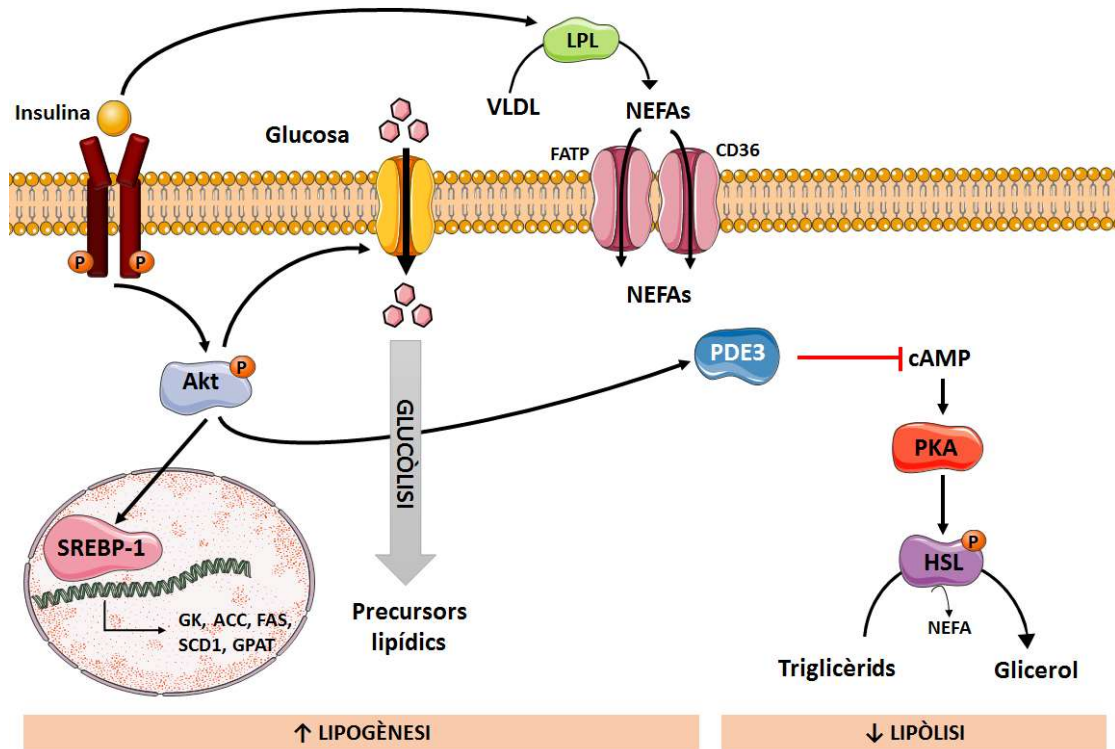


Figura II-13. Mecanismes de regulació de l'homeòstasi lipídica induïts per la insulina.

### 3.1.4. Resistència a la insulina

La resistència a la insulina es defineix com un estat patològic en el que els teixits diana no responen a uns nivells normals d'insulina circulant. En aquestes condicions, les cèl·lules  $\beta$  del pàncrees han de secretar més insulina per tal de poder reduir la glucèmia. Per aquest motiu, la resistència a la insulina té un paper molt important en el desenvolupament de la diabetis tipus 2 i també de la síndrome metabòlica [162].

A nivell molecular, s'han descrit diversos mecanismes que poden causar un defecte en la senyalització de la insulina i com a conseqüència induir la seva resistència.

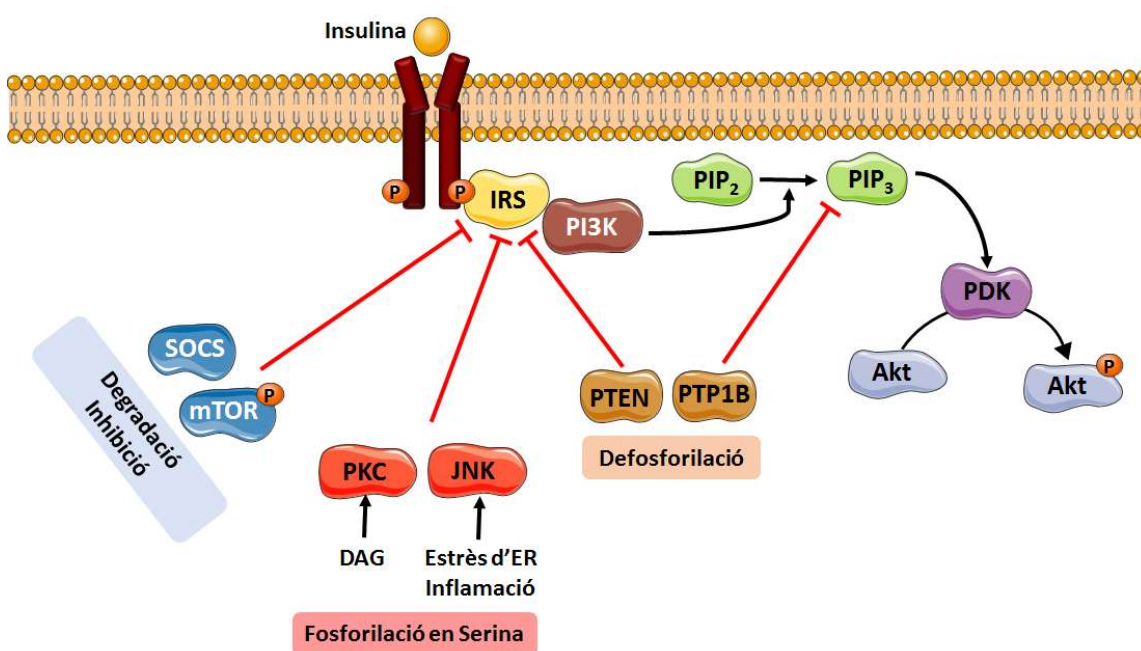
Una de les causes sembla ser l'increment de la fosforilació en serina de les proteïnes IRS, que impedeixen la fosforilació dels residus tirosina i per tant la seva activació. Així, es produeix un dèficit en la cascada de senyalització de la insulina, impedit l'activació de proteïnes com PI3K i Akt. Els receptors IRS poden ser fosforilats en serina per diverses cinases, com per exemple algunes isoformes de la proteïna cinasa C (PKC, *protein kinase C*), les quals són activades per l'acumulació de DAG [184]. També, l'activació de citocines

## II. INTRODUCCIÓ

proinflamatòries, com ara TNF $\alpha$  i IL6, o l'estrès d'ER poden activar la cinasa JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) que fosforila IRS en la posició serina [170,185] (Figura II-14).

Per altra banda, també sembla que la cinasa mTOR estigui implicada d'una manera similar. Tot i que Akt indueix l'activació d'mTOR, s'ha observat que l'activació continuada d'mTOR pot promoure un mecanisme de retroalimentació negativa, ja que la seva forma fosforilada promou la degradació d'IRS-2 i impedeix la senyalització d'IRS-1, a través de la fosforilació en posició serina [177].

Un altre mecanisme que pot ser responsable d'un defecte en la senyalització de la insulina és l'increment de proteïnes que regulen negativament aquesta via. Les proteïnes tirosines fosfatases (PTP, *protein-tyrosine phosphatases*), entre les que destaca PTP1B, defosforilen ràpidament molècules transductores de la via de senyalització de la insulina, promovent la seva inhibició [162]. Així, s'ha observat que ratolins deficients del gen *Ptp1b* induïen la fosforilació en tirosina de les proteïnes IR i IRS i exhibeixen un increment de la sensibilitat a la insulina i, pel contrari, són resistent al desenvolupament de la resistència a la insulina induïda per una dieta rica en greixos [186]. També és important citar la fosfatasa coneguda com a PTEN (*phosphatase and tensin homologue*), capaç de defosforilar i inactivar el PIP3. Per tant, PTP1B i PTEN podrien considerar-se dianes terapèutiques potencials pel tractament de la diabetis tipus 2 [170].



**Figura II-14.** Mecanismes implicats en la resistència a la insulina.

A més, hi ha determinades proteïnes que s'uneixen a components de la via de senyalització de la insulina, produint la seva inhibició. És el cas, per exemple, de la proteïna SOCS (*suppressors of cytokine signaling*), que a part de regular la senyalització de citocines, també s'ha vist que està implicada en el desenvolupament de la resistència a la insulina. SOCS



s'uneix al receptor IR i inhibeix la fosforilació d'IRS-1 i IRS-2, a la vegada que produeix una reducció dels nivells d'IRS-1 i IRS-2 mitjançant una degradació proteasòmica [187]. En aquest sentit, s'ha demostrat que l'expressió de SOCS3 està incrementada en ratolins obesos amb insulinoresistència [188].

### 3.2. Leptina

La leptina és una hormona sintetitzada i secretada majoritàriament pel teixit adipós que té un paper molt important en la regulació de l'homeòstasi energètica. A més, també està involucrada en la regulació neuroendocrina, el sistema immunitari, les respostes inflamatòries i les funcions reproductives, entre d'altres [189,190].

La quantitat de leptina alliberada i per tant circulant es correlaciona directament amb el nombre i la mida dels adipòcits. A més, els nivells de leptina també es modulen en funció de l'estat nutricional: en els períodes de dejú, disminueixen; mentre que s'incrementen en els períodes postprandials. D'aquesta manera, la leptina circulant comunica al cervell l'estat d'energia emmagatzemada [191].

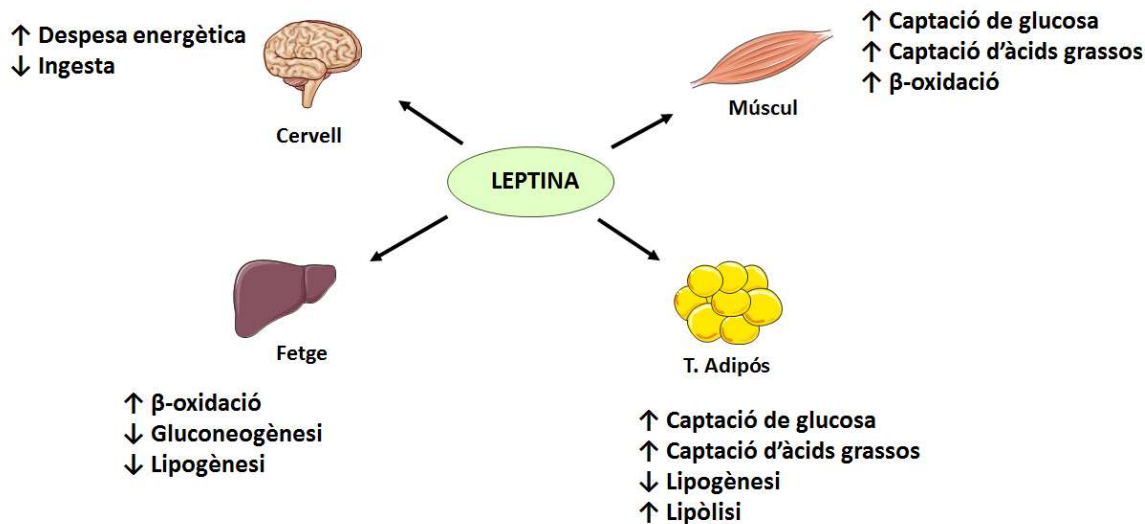
La funció principal de la leptina és promoure la disminució de la ingesta d'aliments i augmentar la despesa energètica. Així, la leptina travessa la BBB i actua principalment en el nucli arcuat de l'hipotàlem on modula l'activitat de diferents neurotransmissors i neuropèptids que regulen la ingesta [190,192].

El nucli arcuat de l'hipotàlem es compon principalment de dos tipus de neurones: les neurones orexigèniques, també conegudes com a neurones AgRP/NPY, que estimulen la gana a través de la producció i l'alliberació del neuropèptid Y (NPY, *neuropeptide Y*) i del pèptid AgRP (*agouti-related peptide*); i les neurones anorexigèniques, també conegudes com a neurones POMC/CART, que inhibeixen la gana a través de la producció de CART (*cocaine- and amphetamine- regulated transcript*) i de POMC (*proopiomelanocortin*), precursor de la hormona estimuladora dels  $\alpha$ -melanòcits (MSH, *melanocyte-stimulating hormones*). En l'hipotàlem, la leptina activa les neurones anorexígenes i inhibeix les orexigèniques, promovent així una reducció de la ingesta i del pes corporal [193,194]. A més, també és responsable de contrarestar els efectes de la grelina, la principal hormona orexigènica [195].

A part de la regulació de la ingesta, la leptina també està implicada en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa tant a nivell central com perifèric [196,197]. Així, la leptina actua en l'hipotàlem i inhibeix la producció hepàtica de glucosa a través del sistema nerviós autònom [198]. També estimula el transport de glucosa afavorint el reclutament del transportador GLUT4 i millorant la sensibilitat a la insulina dels teixits perifèrics [199] (Figura II-15).

## II. INTRODUCCIÓ

Pel que fa al metabolisme lipídic, la leptina afavoreix la captació, la  $\beta$ -oxidació i la lipòlisi dels àcids grassos, i inhibeix la síntesi i emmagatzematge de triglicèrids [195]. Més concretament, s'ha observat que la leptina incrementa els enzims ACO i CPT-1, implicats en la  $\beta$ -oxidació, i disminueix l'expressió d'SREBP-1 que controla la transcripció de diferents gens implicats en la lipogènesi [125]. Pel que fa la lipòlisi, sembla ser que la leptina, a través de l'activació del sistema nerviós simpàtic, promou la fosforilació de la lipasa HSL [139,200]



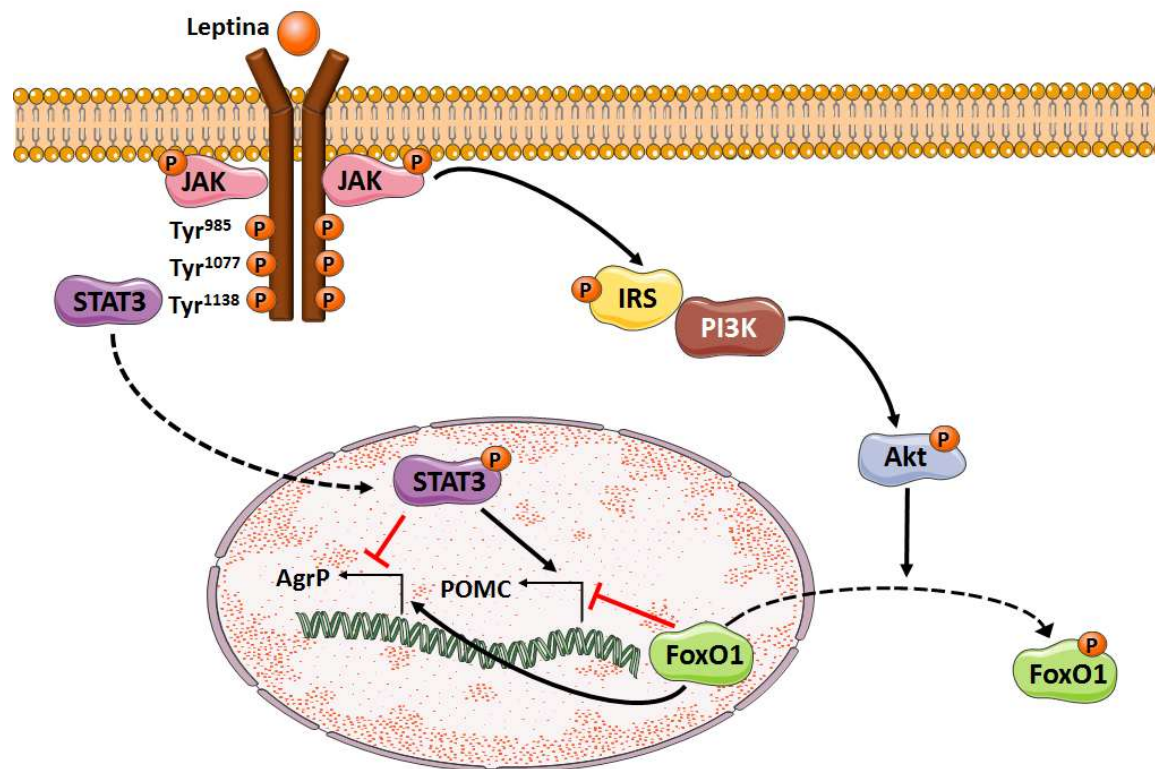
**Figura II-15.** Principals funcions de la leptina en la regulació de l'homeòstasi energètica.

### 3.2.1. Via de senyalització de la leptina

El receptor de la leptina (*LepR*, *leptin receptor*) s'expressa principalment en l'hipotàlem però també en d'altres regions del cervell com el còrtex i l'hipocamp, així com en teixits perifèrics com el múscul esquelètic, el fetge i el teixit adipós [201]. Existeixen 6 isoformes (a-f) del receptor *LepR* que es classifiquen com a isoformes secretades, curtes o llargues. La isoforma *LepRb* és la més llarga i la més important en la senyalització de la leptina [191,192].

Quan la leptina s'uneix al seu receptor, aquest duu a terme un canvi conformacional que permet el reclutament i l'activació de la cinasa *Jak2* (*janus kinase 2*). Un cop activada, *Jak2* s'autofosforila i també fosforila *LepRb* en tres posicions tirosina: Tyr<sup>985</sup>, Tyr<sup>1077</sup> i Tyr<sup>1138</sup>. Cada una d'aquestes fosforilacions indueix l'activació de proteïnes *STAT* (*signal transducers and activators of transcription*) específiques que translocaran al nucli i modularan la transcripció de diferents gens [192,196] (Figura II-16).

La fosforilació en la posició Tyr<sup>1138</sup> activa la senyalització d'*STAT3*, la qual regula els principals efectes de la leptina en l'homeòstasi energètica i en les funcions neuroendocrines, ja que promou la regulació de la transcripció dels neuropèptids *POMC*, *AgRP* i *NPY* [191].



**Figura II-16.** Via de senyalització de la leptina.

Per altra banda, Jak2 també pot fosforilar altres proteïnes, com per exemple IRS. Així, a través de l'activació IRS/PI3K la leptina i la insulina podrien actuar de forma sinèrgica en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa [191,202]. No obstant, s'ha observat que aquest efecte és independent de la via STAT3, ja que ratolins deficients de la senyalització de la leptina induïda per STAT3 no presenten hiperglucèmia, mentre que sí que apareix marcadament als ratolins deficients del receptor de la leptina [203].

A més, tan la insulina com la leptina, a través de la senyalització IRS/PI3K, poden controlar el pes corporal de manera independent de la via Jak2/STAT3 [173,192]. En aquest sentit, s'ha observat que FoxO1 podria regular els efectes anorexígens de la insulina i la leptina a través de la regulació de la transcripció de neuropèptids relacionats amb la ingesta. Tal i com s'ha comentat a l'apartat de la insulina, FoxO1 és un factor de transcripció que pot ser fosforilat i per tant inactivat per Akt. En condicions de dejú, FoxO1 transloca del citoplasma al nucli i incrementa l'expressió del pèptid orexigènic AgRP, mentre que inhibeix l'expressió de POMC, anorexigènic, incrementant així la ingesta de menjar. Per al contrari, quan la insulina i la leptina actuen, s'activa la via PI3K/Akt que promou la inhibició de FoxO1 i conseqüentment de la ingesta [192,204] (Figura II-16). Així, per exemple, estudis en els que s'inhibeix la senyalització per PI3K han demostrat una disminució dels efectes anorexígens de la leptina [205].

La leptina també pot modular l'acció d'AMPK, una cinasa que té un paper crucial en la regulació de l'homeòstasi energètica, ja que integra els senyals hormonals i nutricionals

tant en el cervell com en els òrgans perifèrics. AMPK s'activa en condicions d'estrès metabòlic, causat per una disminució dels nivells d'ATP i un increment d'AMP i ADP [206]. En l'hipotàlem, la leptina inhibeix l'activitat de l'AMPK, reduint la ingesta de menjar [207]; per al contrari, en els teixits perifèrics estimula l'activitat de l'AMPK, promovent les vies catabòliques, com per exemple la  $\beta$ -oxidació i el transport de glucosa [191,208].

### 3.2.2. Resistència a la leptina

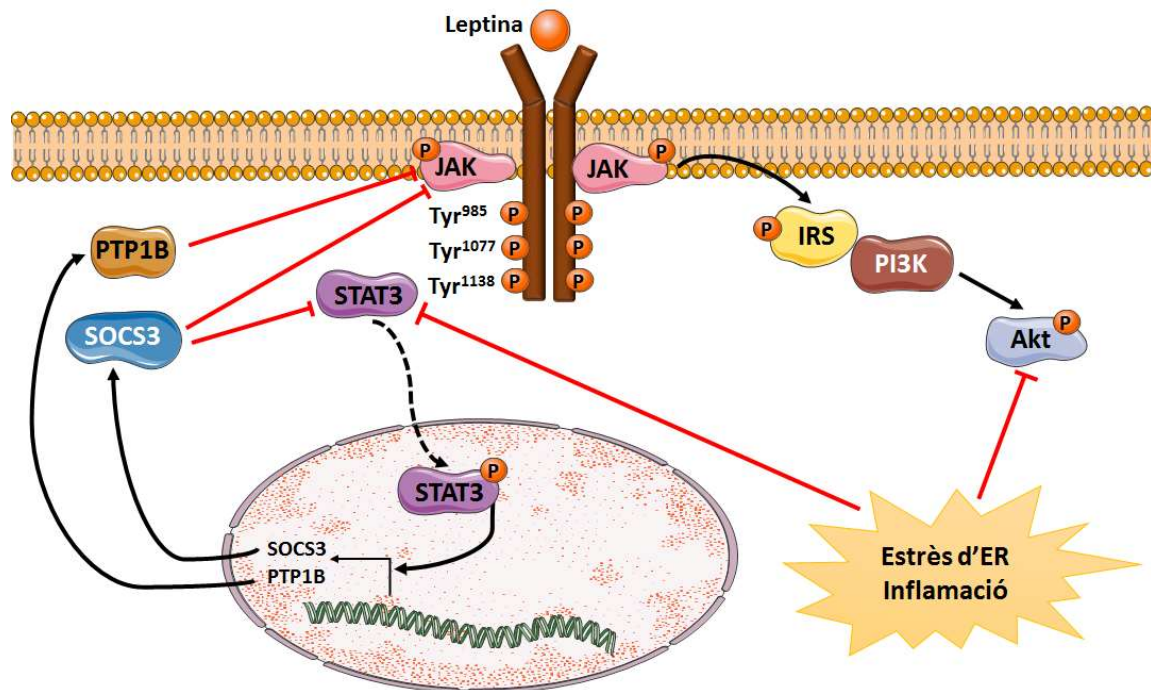
Els principals efectes de la leptina són regular la ingesta i el pes corporal. No obstant, es va observar que tan pacients obesos com models murins als que se'ls havia induït l'obesitat, presentaven nivells alts de leptina en sang, que es correlacionen positivament amb l'adipositat [209,210]. A més, també es va demostrar que en ratolins obesos l'administració exògena de leptina era inefectiva per reduir la ingesta i el pes corporal [211]. Tots aquests efectes suggerien l'aparició d'un estat de resistència a la leptina, és a dir, de la incapacitat de la leptina, ja sigui endògena o exògena, per promoure els seus efectes [212,213].

S'han proposat diversos mecanismes per explicar l'aparició de la resistència a la leptina. En primer lloc, es podria deure a una disminució de la captació de leptina de la sang al cervell, i més concretament en l'hipotàlem, lloc principal d'actuació de la leptina [190,194]. Així, alguns estudis realitzats en humans demostren que en pacients obesos, la leptina perifèrica presenta una forta incapacitat per ser transportada al cervell [210]. S'ha demostrat que la leptina travessa la BBB per endocitosi facilitada per receptor i es creu que aquest receptor podria ser saturable, ja que la captació de leptina per part del cervell no incrementa de forma proporcional als nivells de leptina plasmàtica. A més, aquest transport podria ser inhibit per nivells alts de triglicèrids [190,214]. No obstant, sembla ser que la saturabilitat d'aquest transport varia segons les regions del cervell i es prediu l'existència d'un altre mecanisme de transport. És per això que calen més estudis per determinar els mecanismes específics que faciliten el transport de la leptina de la sang al cervell [213].

Un altre mecanisme responsable de la resistència a la leptina involucra una deficiència en la seva senyalització. D'aquesta manera, una reducció dels nivells del LepRb o una insuficient activació d'STAT3 poden comportar una disminució de la capacitat de transducció de la senyal, induint així una alteració en l'alliberament de neuropèptids com POMC i AgRP [213,215].

En aquest sentit, s'ha observat que diverses proteïnes, com SOCS3 i diferents fosfatases, entre les que destaca PTP1B, poden reduir la senyalització de la leptina. En l'hipotàlem, l'activació d'STAT3 promou la transcripció de SOCS3 i PTP1B, dues molècules que actuen com a reguladors negatius de la senyalització de la leptina. Aquestes molècules, descrites prèviament també en la senyalització de la insulina, interaccionen amb la fosforilació en la posició Tyr<sup>985</sup> del receptor de la leptina, així com amb Jak2, realitzant una inhibició retrospectiva [191,192] (Figura II-17). No obstant, en un estat de resistència a la leptina, els

nivells de SOCS3 i PTP1B augmenten i s'inhibeix la transducció del senyal de la leptina [215,216]. Així, s'ha observat que un increment de SOCS3 en les neurones POMC indueix a una alteració de la senyalització d'STAT3, a una resistència a la leptina i finalment a obesitat [217]. Per altra banda, ratolins deficients de PTP1B presenten una millor sensibilitat a la leptina [218].



**Figura II-17.** Mecanismes implicats en la resistència a la leptina.

En un estat de resistència a la leptina, la via PI3K també està afectada, tot i que de manera diferent a la via STAT3, ja que s'ha observat que la senyalització de PI3K s'altera més ràpidament que la de STAT3 [213]. Així, per exemple, Sahu i col. [219] van descriure que, en rates, la infusió crònica de leptina a nivell central produïa, al cap de dos dies, una alteració de la via PI3K, mentre que no s'observaren defectes en la senyalització d'STAT3.

Els processos inflamatoris, com l'activació d'NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) i l'expressió de citocines inflamatòries com ara IL-1, TNF $\alpha$ , també poden ser responsables de la resistència a la leptina en l'hipotàlem [192,220]. Així, per exemple, Benzler i col. [221] van observar que la inhibició de la senyalització d'NF- $\kappa$ B en neurones del nucli arcuat de l'hipotàlem atenua l'increment de la ingesta i del pes corporal induïts per la ingesta de dietes riques en greixos, així com l'expressió de SOCS3, indicant una millor sensibilitat a la leptina.

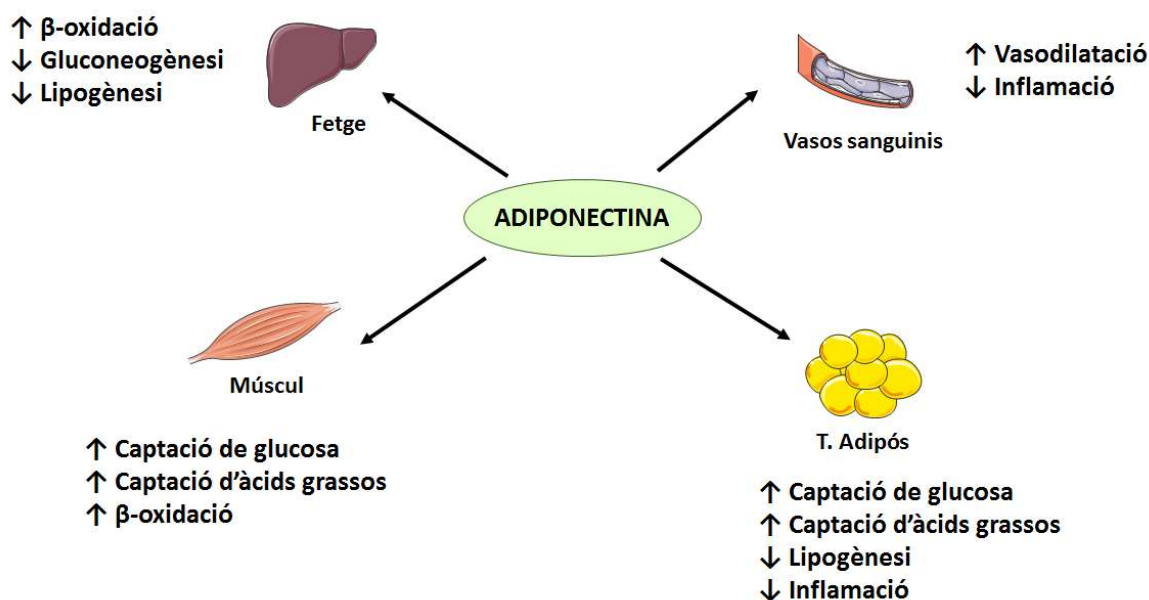
Per altra banda, també hi ha certa evidència que l'estrès d'ER podria estar relacionat amb la resistència a la leptina [194,222]. En aquest sentit, s'ha observat que models murins que ingereixen dietes que indueixen a l'obesitat expressen nivells elevats de molècules relacionades amb l'estrès d'ER en l'hipotàlem [192,223]. A més, s'ha demostrat que l'administració d'un inductor de l'estrès d'ER, atenua els efectes de la leptina i la insulina en el hipotàlem a través de la inactivació d'STAT3 i d'Akt [224].

### 3.3. Adiponectina

L'adiponectina és una hormona produïda i secretada pel teixit adipós, de gran importància en la regulació homeostàtica de l'energia. Se secreta a la circulació sanguínia en diferents formes: trimèrica, hexamèrica i d'alt pes molecular. Aparentment, cada forma modula funcions específiques en diferents teixits [225,226].

A diferència de la majoria d'adipocitocines, els nivells d'adiponectina són inversament proporcionals a l'obesitat i al grau de resistència a la insulina [226,227]. Per aquest motiu, s'ha observat que tan en humans com en models animals obesos l'expressió d'adiponectina és baixa [228,229]

L'adiponectina està implicada en un gran nombre d'activitats biològiques. Entre elles, destaca la capacitat per millorar la sensibilitat a la insulina als principals òrgans diana, la modulació de la resposta inflamatòria i la regulació del metabolisme energètic [225] (Figura II-18).



**Figura II-18.** Efectes de l'adiponectina en diferents òrgans.

Està àmpliament acceptat que l'adiponectina actua com a sensibilitzador de la insulina, ja que afavoreix la captació de glucosa i disminueix la gluconeogènesi. Diversos estudis han observat que la seva administració intraperitoneal redueix els nivells de glucosa en plasma, a la vegada que baixos nivells d'adiponectina s'han relacionat amb la resistència a la insulina [230,231].

Pel que fa al metabolisme lipídic, l'adiponectina inhibeix la lipogènesi i l'acumulació de triglicèrids en el fetge i en el múscul, mentre que incrementa l'oxidació d'àcids grassos. Totes aquestes accions afavoreixen també la sensibilitat a la insulina [127,225].

A nivell vascular, l'adiponectina promou un increment de la producció d'òxid nítric (NO, *nitric oxide*) i redueix l'expressió de molècules d'adhesió a les cèl·lules endotelials, facilitant així la vasodilatació endotelial [226,232].

A més, l'adiponectina també presenta una activitat antiinflamatòria, ja que s'ha observat que inhibeix la producció de ROS, de citocines inflamatòries com TNF $\alpha$  i IL-6 i la senyalització d'NF- $\kappa$ B, mentre que indueix l'expressió de citocines antiinflamatòries com IL-10. [225,227]. D'aquesta manera, a través de la regulació de la resposta inflamatòria, l'adiponectina també afavoreix indirectament la sensibilitat a la insulina. En aquest sentit, s'ha observat que tan els nivells d'adiponectina com dels seus receptors estan disminuïts en un estat d'inflamació crònica associada a diabetis, obesitat i resistència a la insulina [233].

### 3.3.1. Via de senyalització de l'adiponectina

L'adiponectina actua sobre els receptors anomenats AdipoR (*adiponectin receptor*)<sup>1</sup> i AdipoR2. Són receptors transmembrana que s'expressen ubiquament, tot i que AdipoR1 és més abundant en el múscul esquelètic i AdipoR2 predomina en el fetge [228,234]. No obstant, en cap dels dos receptors de l'adiponectina s'ha detectat la presència d'una activitat cinasa intrínseca o fosforilació que pugui transmetre la senyalització de l'adiponectina, fet que indica que probablement els receptors d'adiponectina s'uneixen a altres molècules que sí permeten la senyalització. En aquest sentit, s'ha identificat APPL1 (*Adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine binding domain, and leucine zipper motif*), una proteïna adaptadora amb múltiples dominis funcionals que s'uneix directament als dominis intracel·lulars dels receptors AdipoR1 i AdipoR2 i permet regular les accions de l'adiponectina [235,236]. APPL1 activa diferents vies de senyalització principalment a través de l'activació d'AMPK.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, AMPK és una proteïna amb activitat serina/treonina cinasa regulada per AMP que té un paper molt important en el control de l'estat metabòlic cel·lular. La seva activació té lloc a través de la fosforilació en la posició Thr<sup>172</sup> regulada per LKB1 (*liver kinase B1*) i promou la fosforilació de diferents vies, afavorint els processos catabòlics i inhibint els processos anabòlics que consumeixen ATP [192,225,235]. A continuació es detallaran algunes d'aquestes vies (Figura II-19).

En primer lloc, AMPK fosforila i inactiva ACC, enzim clau en la síntesi d'àcids grassos. Això produeix una reducció dels nivells de malonil-CoA que, al seu torn, és un inhibidor al·lostèric de l'enzim CPT-1, enzim clau en l'oxidació. Així, AMPK al fosforilar i inactivar ACC, inhibeix la síntesi d'àcids grassos a la vegada que augmenta la seva oxidació [225,237]. AMPK també redueix la síntesi de triglicèrids mitjançant la inhibició de l'expressió de gens lipogènics com ara FAS i GPAT, a través de la reducció de l'expressió d'SREBP-1c i de la

## II. INTRODUCCIÓ

fosforilació de ChREBP, que redueix la seva capacitat d'unió als diferents elements de resposta [238,239].

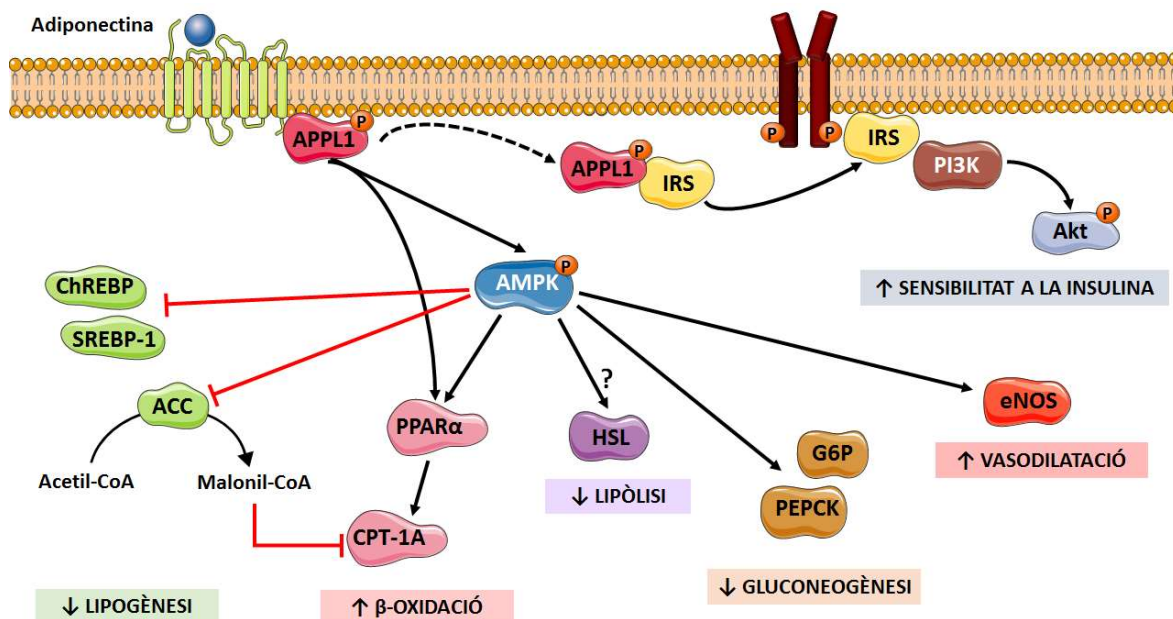


Figura II-19. Via de senyalització de l'adiponectina.

Pel que fa a la hidròlisi dels àcids grassos, s'ha demostrat que l'adiponectina inhibeix la lipòlisi en el teixit adipós probablement a través de l'activació d'AMPK, que al seu torn inhibiria la lipasa HSL [240,241]. No obstant, hi ha certa controvèrsia en els efectes de l'adiponectina sobre la lipòlisi, ja que recentment, també s'ha observat que l'activació d'AMPK provoca una activació de la lipasa ATGL [242].

L'adiponectina, especialment a través d'AMPK, també inhibeix l'expressió de G6P i de PEPCK, principals enzims involucrats en la gluconeogènesi [237]. A més, s'ha observat que facilita la captació de glucosa tant en el fetge com en els òrgans perifèrics, on incrementa la translocació de GLUT4 [234,236]. Aquesta translocació es duu a terme a través de l'activació d'AMPK, p38 MAPK i també mitjançant la interacció de la GTPasa Rab5 (*Ras-associated protein 5*) amb APPL1. Així, s'ha observat que una sobreexpressió d'APPL1 incrementa la translocació de GLUT4 a la membrana [236,243].

L'activació d'AMPK també regula l'activitat antiinflamatòria de l'adiponectina, així com la producció d'NO [228,244]. En les cèl·lules endotelials, l'activació d'AMPK induïx la fosforilació d'eNOS, resultant en un increment de la producció d'NO [228,232,245].

Per altra banda, l'adiponectina, ja sigui directament o bé a través d'AMPK, també regula PPAR $\alpha$ , un factor de transcripció clau en el metabolisme. Així, incrementa els nivells de PPAR $\alpha$  promovent l'oxidació d'àcids grassos [225,239,246]. A més, en el fetge, l'adiponectina incrementa l'expressió de gens diana de PPAR $\alpha$ , com CD36 que facilita la captació i el metabolisme dels àcids grassos [247].



Pel que fa a la relació entre les vies de la insulina i l'adiponectina, s'ha demostrat que APPL1 potencia la senyalització d'Akt induïda per insulina [236]. Així, s'ha observat que en condicions basals, APPL1 forma un complex amb IRS, que quan és estimulat per adiponectina o insulina, promou la unió del substrat IRS al receptor IR, activant així la senyalització de la insulina [248]. A més, també s'ha observat que l'adiponectina promou la fosforilació d'IR i d'IRS [227,233].

En el CNS, en condicions de dejú, l'expressió d'adiponectina i dels seus receptors s'incrementa en el nucli arcuat de l'hipotàlem. L'augment d'adiponectina indueix a un increment de l'activitat d'AMPK que, al seu torn, promou la ingesta de menjar [249].

### 4. EL RETICLE ENDOPLASMÀTIC

L'ER és un orgànul amb un paper molt important en l'homeòstasi cel·lular, ja que, entre d'altres funcions, s'encarrega de controlar la síntesi, el plegament i la maduració de les proteïnes. Aquelles que presenten un bon plegament són exportades a l'aparell de Golgi, mentre que les que tinguin un plegament incomplet es mantenen en l'ER per completar el procés de plegament o bé són degradades pel procés anomenat ERAD (*endoplasmic reticulum-associated degradation*) [250,251].

En condicions normals, hi ha un equilibri entre la càrrega de proteïnes en l'ER i la seva capacitat de plegament. No obstant, alteracions en l'homeòstasi de l'ER, a causa per exemple d'un increment en la síntesi de proteïnes o una acumulació de proteïnes mal plegades, indueixen a una condició anomenada estrès d'ER [250].

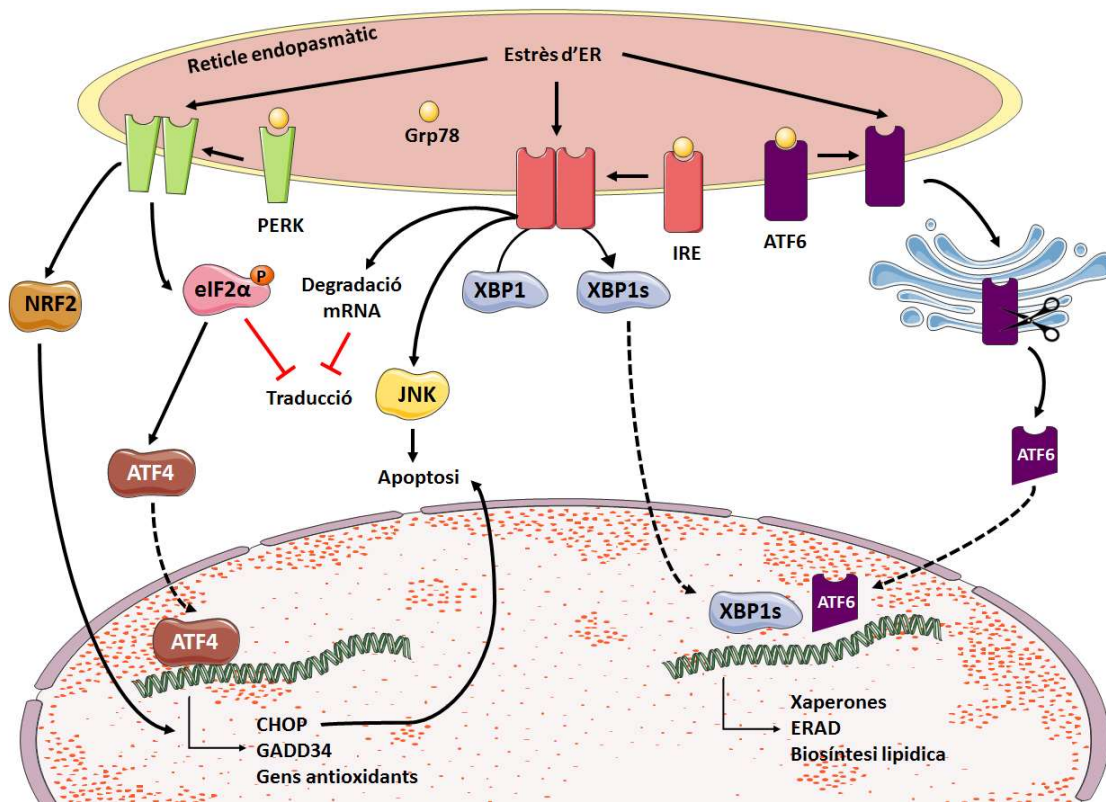
#### 4.1. Estrès d'ER

L'estrès d'ER promou la resposta UPR (*unfolded protein response*), la qual té com a principal objectiu restablir l'homeòstasi de l'ER, incrementant la capacitat de plegament de proteïnes i reduint la càrrega de proteïnes mal plegades. Amb aquesta finalitat, l'UPR promou l'expansió de la membrana de l'ER, l'expressió de la maquinària necessària per realitzar el plegament i la degradació de proteïnes mal plegades, mentre que inhibeix la traducció de proteïnes [251,252].

L'UPR consta de tres branques que actuen en paral·lel i de forma coordinada. S'activen a través de tres proteïnes transmembrana de l'ER que actuen com a sensors: IRE1 (*inositol requiring protein-1*), PERK (*protein kinase RNA-like ER kinase*) i ATF (*activating transcription factor*) 6 (Figura II-20). En condicions normals, aquests transductors es mantenen inactius a través de la interacció amb la xaperona BiP, també coneguda com a Grp78 (*glucose-regulated protein, 78-KD*). L'estrès d'ER incrementa la unió de Grp78 amb les proteïnes mal plegades, el que provoca la seva dissociació d'IRE, PERK i ATF6 promovent la seva activació [194,253].

IRE1 és el sensor de l'estrès d'ER més estudiat i conservat evolutivament. L'activació d'IRE1 indueix la seva capacitat endoribonucleasa que promou la fragmentació de l'mRNA d'XBP1 (*X-box binding protein 1*). IRE1 elimina un intró de 26 parells de bases i els dos fragments resultants condueixen a la traducció d'una proteïna de pes molecular més elevat, anomenada XBP1s (*XBP1 spliced form*). XBP1s és un factor de transcripció que indueix l'expressió de gens que incrementen la capacitat de plegament de l'ER, el procés ERAD i la biosíntesi lipídica, com ara *dnajb9* (*DnaJ/Hsp40 homolog, subfamily B, membre 9*), *edem1* (*endoplasmic reticulum degradation-enhancer alpha-mannosidase-like protein 1*) o *sec61α1* (*sec61 complex, alpha-1 subunit*) [253,254]. IRE1 també promou l'activació de JNK que indueix apoptosi i inhibició de la senyalització de la insulina. A més, s'ha observat que

IRE1 degrada mRNA específics gràcies a l'activitat RNAsa, un procés conegut amb el nom de RIDD (*regulated IRE1-dependent decay*), que probablement té l'objectiu de reduir la síntesi de proteïnes que requereixen plegament en l'ER [250,251,253].



**Figura II-20.** Via de senyalització de l'estrès de reticle endoplasmàtic. Adaptada de Cnop i col. [251]

PERK és una cinasa amb activitat treonina-serina que, de la mateixa manera que IRE1, s'activa a través d'autofosforilació. Un cop activada, PERK fosforila el factor iniciador de la traducció eIF2 $\alpha$ , (*eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*), fet que produeix una atenuació de la traducció de proteïnes i una reducció de la càrrega proteica en l'ER. No obstant, la fosforilació d'eIF2 $\alpha$  promou la traducció selectiva d'ATF4, el qual induïx d'alguns gens com CHOP (*C/EBP $\alpha$ -homologous protein*) i GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein*). CHOP és un factor de transcripció que controla gens involucrats en l'apoptosi, mentre que GADD34 activa la desfosforilació de eIF2 $\alpha$ , a través de PP1 i per tant atenua la inhibició de la traducció mitjançant un mecanisme de retroalimentació negativa. PERK també fosforila NRF (*nuclear factor erythroid related factor*)2, un factor de transcripció de la resposta antioxidant. A més, quan eIF2 $\alpha$  és marcadament incrementat, s'inhibeix la traducció d'I $\kappa$ B (*inhibitor of  $\kappa$ B*), fet que promou una activació de la resposta inflammatòria a través de la senyalització de NF $\kappa$ B [251,252].

La tercera via és iniciada per ATF6. Quan hi ha un estrès d'ER, ATF6 transloca de l'ER a l'aparell de Golgi, on és processada per les proteases S1P i S2P (*site-1, site-2 proteases*) alliberant el fragment N-terminal d'ATF6. Aquest fragment migra al nucli on actua com a

factor de transcripció incrementant l'expressió d'XBP1 i de xaperones involucrades en l'ERAD, la biosíntesi de lípids i el plegament de proteïnes, com Grp78 o Grp94 [250,255].

No obstant, cal remarcar que l'activació de l'UPR no sempre resulta amb una restauració de l'equilibri en l'ER. Una activació prolongada de l'UPR pot conduir a una disfunció crònica de l'òrganul, incapaç de resoldre l'estrès de l'ER. Així, l'UPR pot iniciar la mort cel·lular, a través de la regulació de l'apoptosi induïda principalment per CHOP i JNK [194,251].

### 4.2. Estrès d'ER i metabolisme

Diversos estudis i revisions evidencien la interacció de l'estrès d'ER i l'UPR amb diferents vies metabòliques com la inflamació, la senyalització de la insulina i el metabolisme glucídic i lipídic [253,256]. A continuació, es detallarà la relació entre l'estrès d'ER i algunes d'aquestes vies de senyalització.

#### 4.2.1. Estrès d'ER i metabolisme lipídic

La resposta UPR té un paper molt important en la regulació del metabolisme lipídic. Diversos estudis han examinat les funcions de les diferents branques de la resposta UPR en el metabolisme lipídic [257].

SREBP-1c, tal i com s'ha mencionat anteriorment, és un factor de transcripció molt important en la regulació de la lipogènesi. De la mateixa manera que ATF6, SREBP-1c es troba associat a Grp78 i per la seva activació requereix la seva dissociació i el processament en l'aparell de Golgi. Així, quan s'indueix l'estrès d'ER, també es promou l'activació d'SREBP-1c i, conseqüentment, s'incrementa l'expressió de gens involucrats en la lipogènesi [251,258].

Per altra banda, també s'ha demostrat que XBP1 activa directament l'expressió d'SREBP-1c [259] així com de gens lipogènics com SCD1, DGAT i ACC [260]. En aquest sentit, estudis realitzats per Lee i col. [254] mostren que ratolins deficientes en XBP1 presenten una important disminució de l'expressió d'aquests gens lipogènics. A més, apunten que XBP1 és un regulador crucial de la lipogènesi, ja que dietes riques en carbohidrats incrementen l'expressió dels gens lipogènics en animals *wildtype* però no en animals deficientes d'XBP1.

No obstant, s'ha descrit que IRE1, a través del procés RIDD, és capaç de degradar l'mRNA d'alguns enzims lipogènics, inhibint la lipogènesi hepàtica [261].

També, s'ha observat que l'estrès d'ER, a través d'un mecanisme dependent de PERK, promou l'acumulació de VLDL en el fetge, ja que incrementa l'expressió hepàtica de VLDLR [262], i afecta la producció de VLDL, ja que promou la degradació d'Apo B-100 [263,264].

#### 4.2.2. Estrès d'ER i gluconeogènesi

L'estrès de reticle també està relacionat amb el procés de gluconeogènesi. No obstant, en funció de quina branca de la resposta UPR s'activa, la gluconeogènesi pot ser potenciada o inhibida [255].

Estudis realitzats per Zhang i col. demostren que PERK indueix l'activació de FoxO1 a través de la fosforilació en la posició Ser<sup>298</sup>. Així, PERK podria contrarestar els efectes de la insulina via Akt, promovent un increment de l'activitat de FoxO1 i per tant, de la transcripció de gens gluconeogènics com PEPCK i G6P [265]. A més, PERK a través d'eIF2 $\alpha$  també podria estimular la síntesi de glucosa hepàtica, incrementant la traducció de C/EBP (CCAAT-enhancer-binding protein) $\alpha$  i C/EBP $\beta$ , els quals, al seu torn, poden regular la gluconeogènesi així com l'expressió de PPAR $\gamma$  [266].

En canvi, s'ha observat que XBP1s interacciona directament amb el factor de transcripció FoxO1, provocant la seva degradació i per tant la disminució de l'expressió d'enzims gluconeogènics. En conseqüència, disminueix la síntesi de glucosa hepàtica [267]. En aquest mateix sentit, també s'ha descrit que ATF6 s'uneix a CRTC2 (*CREB regulated transcription coactivator 2*), un coactivador de CREB, de manera que l'activació d'ATF6 promou la dissociació de la interacció CREB-CRTC2 i com a conseqüència la inhibició de l'expressió de gens gluconeogènics [268].

#### 4.2.3. Estrès d'ER i resistència a la insulina

L'activació de l'UPR s'ha associat al desenvolupament de la resistència a la insulina. Així, s'ha observat que inductors de l'UPR alteren la senyalització de la insulina [269], mentre que xaperones que redueixen l'estrès d'ER la milloren [270].

L'estrès d'ER pot contribuir al desenvolupament de la resistència a la insulina a través de l'estimulació de cinases que poden interferir en la senyalització de la insulina. En aquest sentit, diversos estudis han demostrat que IRE1 promou l'activació de JNK que indueix la fosforilació d'IRS-1 en la posició serina, inactivant la senyalització de la insulina [270,271].

També s'ha observat que la insulina activa la via d'XBP1, ja que la interacció física d'XBP1s amb p85, la subunitat reguladora de PI3K, facilita la seva translocació al nucli [272].

A més, l'estrès d'ER també pot induir la resistència a la insulina indirectament, ja que promou l'alteració d'enzims involucrats en la lipogènesi i gluconeogènesi així com de citocines proinflamatòries. De fet, les tres branques d'UPR s'han associat amb la resposta inflamatòria [273].

Així, s'ha observat que l'activació d'IRE, ATF6 i PERK indueixen l'activació d'NF- $\kappa$ B que promou la síntesi de citocines inflamatòries [256,274]. Pel que fa la via PERK, tal i com s'ha comentat, la seva activació pot produir una inhibició de la traducció d'I $\kappa$ B, que resulta amb

## II. INTRODUCCIÓ

---

una reducció de la ratio I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B, que indueix la translocació de NF $\kappa$ B al nucli i, consegüentment, incrementa l'expressió de gens inflamatoris [275]. Per altra banda, l'activació d'IRE promou la fosforilació de JNK que també indueix la resposta inflamatòria [256,276].

## 5. FUNCIO VASCULAR

### 5.1. L'endoteli

L'endoteli és una capa unicel·lular que cobreix la superfície més interna dels vasos sanguinis. Presenta múltiples funcions com ara permetre l'intercanvi de molècules entre la sang i els teixits, regular la coagulació i la fibrinòlisi, així com la resposta immune i inflamatòria. A més, també controla la reactivitat vascular a través de l'alliberament de substàncies anomenades EDRF (*endothelium-derived relaxing factors*) que indueixen a la relaxació, i de substàncies anomenades EDCF (*endothelium-derived constricting factors*) que promouen la contracció [277,278].

Entre les substàncies EDRF, l'NO és la substància vasodilatadora més important i més ben caracteritzada. També presenta accions antiinflamatòries, antiagregants plaquetàries antiproliferatives i antimigratòries que contribueixen al manteniment de l'endoteli [277]. No obstant, la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>, *prostacyclin*), produïda per la PGIS (*prostacyclin synthase*) i un grup d'EDRF, anomenats EDHF (*endothelium-dependent hyperpolarizations factors*) també tenen un paper destacat en la regulació de la vasodilatació [75].

Pel que fa les substàncies EDCF, l'endotelina-1 (ET-1, *endothelin-1*) i l'angiotensina II (Ang-II, *angiotensin-II*) s'han identificat com els factors que produeix l'endoteli amb més poder contràctil [75]. De fet, diversos estudis suggereixen que l'ET-1 actua com a mediador de la vasconstricció promoguda per Ang-II [279,280]. També, algunes prostaglandines produïdes per la ciclooxigenasa (COX, *cyclooxygenase*), com ara el tromboxà A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>, *thromboxane A<sub>2</sub>*), s'han associat amb la contracció dependent de l'endoteli [281].

### 5.2. Regulació del to vascular

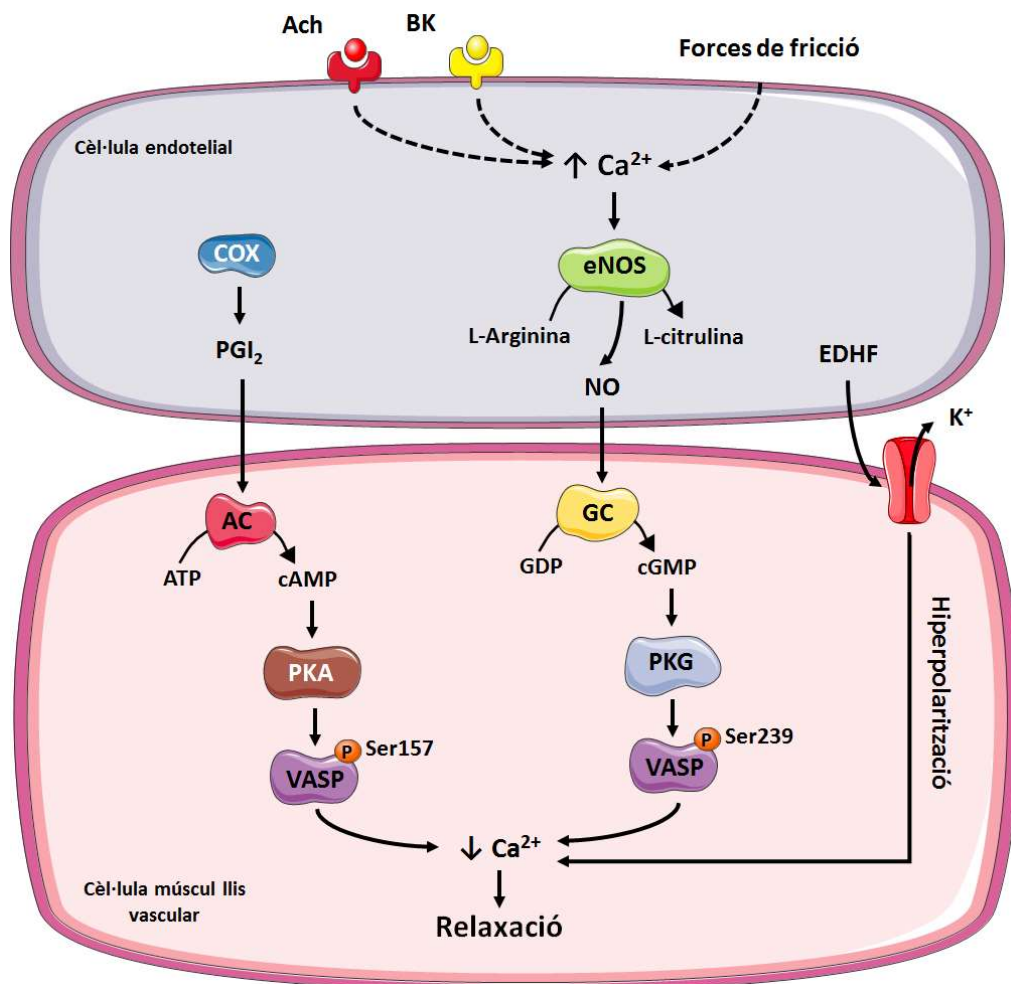
Les substàncies vasodilatadores i vasoconstrictores regulen el to vascular a través de l'activació de diferents vies de senyalització.

L'NO es considera el principal promotor de la vasodilatació dependent de l'endoteli (EDV, *endothelial-dependent vasodilatation*). Se sintetitza en les cèl·lules endotelials gràcies a l'acció d'eNOS que catalitza l'oxidació de L-arginina per formar NO i L-citrulina. Aquesta reacció requereix O<sub>2</sub> i NADPH com a cosubstrats i diferents cofactors com ara BH<sub>4</sub> (*tetrahydrobiopterin*), FAD i FMN [282].

eNOS pot activar-se per un increment dels nivells de calci intracel·lulars o bé per fosforilació. La força de fricció (*shear stress*) que exerceix el flux sanguini laminar al circular pels vasos sanguinis així com l'activació de receptors específics endotelials, en resposta a substàncies com l'Ach i la bradiginina (BK, *bradykinin*), poden incrementar els nivells de Ca<sup>2+</sup> i per tant induir la síntesi d'NO [283] (Figura II-21). Respecte la fosforilació, eNOS pot

## II. INTRODUCCIÓ

fosforilar-se en diferents residus Ser, Thr i Tyr a través de cinases així com de diversos estímuls mecànics, metabòlics i humorals [284]. Amb tot, la fosforilació en la posició Ser<sup>1177</sup> sembla ser la més important en promoure l'activació d'eNOS. Així, per exemple, l'adiponectina i la insulina, tal i com s'ha descrit en capítols anteriors, a través de l'activació d'AMPK i de la via PI3K/Akt respectivament, estimulen la síntesi d'NO en les cèl·lules endotelials mitjançant la fosforilació d'eNOS en la posició Ser<sup>1177</sup> [239,282,285].



**Figura II-21.** Vies de senyalització que promouen la relaxació de les cèl·lules del múscul llis vascular.

L'NO produït difon des de les cèl·lules endotelials cap a les cèl·lules del múscul llis vascular on indueix l'activació de l'enzim guanilat-ciclasa soluble (GCS, *soluble guanylate cyclase*) que resulta amb un increment dels nivells cel·lulars del segon missatger cGMP [277].

L'increment de cGMP intracel·lular indueix l'estimulació de la proteïna cinasa dependent de cGMP (PKG, *cGMP-dependent protein kinase*), que promou la relaxació de les cèl·lules musculars a través de la inhibició de l'entrada de calci a la cèl·lula, provocant una disminució del calci intracel·lular, necessari per la interacció de les proteïnes contràctils [286]. A més, cGMP també promou la relaxació a través de la fosforilació de diferents



proteïnes com la MLCP (*myosin light chain phosphatase*) i la proteïna VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*) en la posició Ser<sup>239</sup> [287,288].

Per altra banda, a part de la via de senyalització NO/cGMP/PKG, també hi ha altres vies que poden induir la relaxació de les cèl·lules musculars, com ara la via dependent de cAMP [18].

Els nivells de cAMP es poden veure modulats per l'alliberament de diverses substàncies com ara PGI<sub>2</sub> i epinefrina, a través de l'activació dels receptors IP (*prostacyclin receptor*) i β<sub>2</sub>-adrenèrgics, respectivament. Mitjançant proteïnes G acoblades, l'activació d'aquests receptors indueix l'enzim adenilat ciclasa (AC) que resulta amb un increment de cAMP [277].

Quan els nivells de cAMP s'incrementen en les cèl·lules del múscul llis vascular, s'activa l'enzim PKA que, de manera similar a PKG, promou la relaxació a través d'una disminució dels nivells de calci de les cèl·lules musculars i de la fosforilació de determinades proteïnes com MLCP i VASP en la posició Ser<sup>157</sup> [289,290].

Usualment, s'ha considerat la via NO/cGMP/PKG dependent de l'endoteli, mentre que la via cAMP/PKA independent. No obstant, alguns estudis suggereixen que la vasodilatació promoguda per cAMP també podria estar associada a l'endoteli [289].

La proteïna VASP és una proteïna que s'associa amb els filaments d'actina, les adhesions focals i els contactes entre cèl·lules amb un paper molt important en el control de la dinàmica del citoesquelet. Diversos estudis han utilitzat la proteïna VASP per estudiar l'activitat de les cinases PKG i PKA, ja que s'ha identificat com un substrat validat de les mateixes [288,291,292]. D'aquesta manera, la proteïna VASP és fosforilada en la posició Ser<sup>239</sup> a través de la via NO/cGMP/PKG, mentre que la fosforilació en la posició Ser<sup>157</sup> es deu principalment a l'activació de la senyalització cAMP/PKA [289].

Un tercer procés bioquímic que regula la vasodilatació és la formació d'EDHF. L'EDHF produeix la relaxació de les cèl·lules vasculars a través de l'activació de canals de K<sup>+</sup> que indueixen l'hiperpolarització de la membrana. La seva síntesi és estimulada, entre d'altres lligands, per l'Ach i la BK i té un paper destacat en la modulació del to vascular, especialment en els vasos sanguinis petits [287,293].

Pel que fa als processos que promouen la contracció, diverses substàncies com ET-1 i Ang-II, així com l'epinefrina i la norepinefrina indueixen la contracció de les cèl·lules del múscul llis vascular a través de l'activació de receptors específics: ET<sub>A</sub> (*endothelin receptor type A*), AT<sub>1</sub> (*angiotensin II type 1-receptor*) i α<sub>1</sub>-adrenèrgics, respectivament. L'activació d'aquests receptors, acoblats a proteïnes G, promou un increment d'IP<sub>3</sub>, un segon missatger que indueix a l'augment de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular, fet que promou la contracció del múscul llis vascular [280,287].

### 5.3. Disfunció endotelial

La disfunció endotelial és una alteració de la capacitat endotelial per mantenir l'equilibri entre la producció de substàncies EDRF i EDCF. S'han identificat diversos mecanismes que poden contribuir a la disfunció endotelial com ara una reducció dels nivells d'EDRF, un increment de la síntesi d'EDCF o bé una sobreexpressió de les espècies reactives d'oxigen (ROS, *reactive oxygen species*) [75,281].

Entre aquests mecanismes, la reducció de la biodisponibilitat de l'NO té un paper principal en el desenvolupament de la disfunció endotelial. En primer lloc, l'increment de la inactivació d'NO, principalment promogut per ROS, pot alterar la seva biodisponibilitat. Així, un augment de l'activitat dels enzims NADPH oxidases (Nox, *NADPH oxidases*) indueix a un increment de ROS, especialment d'anions superòxid ( $O_2^-$ ) que reaccionen ràpidament amb l'NO per formar peroxinitrit ( $ONOO^-$ ). Això produeix una reducció dels nivells d'NO que contribueix a l'alteració de la vasodilatació [278,294].

En segon lloc, una disminució de l'expressió i/o de l'activitat de l'enzim eNOS també pot induir una menor formació d'NO. En aquest sentit, l'estrès oxidatiu pot promoure un desacoblament de l'enzim eNOS, un procés en el qual eNOS deixa de generar NO i genera anions superòxids. Entre els mecanismes implicats en el desacoblament d'eNOS destaquen l'oxidació del cofactor  $BH_4$ , una disminució del substrat L-arginina o una acumulació de metilarginines [278]. A més, la hipòxia, altes concentracions d'LDL oxidades, citocines o liposacàrids poden reduir l'expressió d'eNOS [283].

L'activitat d'eNOS també pot ser modulada per hormones com la insulina i l'adiponectina [281]. Pel que fa a la insulina, diversos estudis evidencien que la resistència a la insulina redueix la vasodilatació endotelial, a causa d'una manca d'activació d'eNOS [295]. Inversament, eNOS té un paper important en la regulació de la sensibilitat a la insulina gràcies als seus efectes perifèrics [278]. En aquest sentit, estudis realitzats per Duplain i col. [296] van observar que la deficiència d'eNOS en ratolins promou el desenvolupament de resistència a la insulina, d'hiperlipidèmia i d'hipertensió. Per altra banda, una alteració dels nivells d'adiponectina en plasma també podria modular els nivells d'NO [285].

Igualment, una disminució dels nivells de cAMP i cGMP pot contribuir a un dèficit de la senyalització de les vies que promouen la vasodilatació. Les PDE són una família d'enzims que degraden cGMP i cAMP. En les cèl·lules vasculares, la isoforma PDE5 es considera la principal responsable de la hidròlisi de cGMP, mentre que la PDE4 de la hidròlisi de cAMP [288,290]. Així, un increment d'aquests enzims pot promoure una reducció de cAMP i cGMP i per tant de la relaxació de les cèl·lules del múscul llis vascular.

Per altra banda, a part d'eNOS, a l'endoteli hi ha una altre isoforma de l'enzim NOS, la iNOS (*inducible nitric oxide synthase*). A diferència d'eNOS, iNOS és independent de calci. En condicions basals, l'activitat d'iNOS és molt baixa, mentre que en resposta a l'estrès

cel·lular o durant els processos inflamatoris iNOS és estimulada. En un estat inflamatori, la quantitat d'NO produïda per iNOS és molt superior a la produïda per eNOS i, a més, iNOS pot mantenir-se actiu durant diversos dies. iNOS també s'ha detectat en plaques arterioscleròtiques i l'alliberament de grans quantitats d'NO s'ha associat amb la producció de ROS [297,298]. D'aquesta manera, s'ha descrit que la inducció d'iNOS també contribueix al desenvolupament de la disfunció endotelial [299].

Respecte EDCF, un increment de la seva producció també contribueix al desenvolupament de la disfunció endotelial [281]. En aquest sentit, s'ha observat que tant models animals [300,301] com pacients diabètics [279,302] que havien desenvolupat disfunció endotelial presentaven un increment de l'activitat de l'enzim COX, de la síntesi de TxA2 així com dels nivells d'ET-1 i d'Ang-II.

Finalment, cal esmentar que diversos factors com la hipertrigliceridèmia, l'hipercolesterolèmia i la inflamació poden promoure la disfunció endotelial, i que aquesta s'ha associat amb alteracions com l'arteriosclerosi, la hipertensió i la resistència a la insulina que contribueixen al desenvolupament de malalties cardiovasculars i diabetis [278,281].

### 6. FUNCIÓ COGNITIVA

#### 6.1. La cognició

La cognició es defineix com la capacitat per desenvolupar coneixements. En altres paraules, la cognició és l'habilitat per adquirir i processar informació a la que s'accedeix a través de diferents fonts com l'experiència i la percepció, i convertir-la en coneixement. Hi ha diversos processos cognitius com ara l'aprenentatge, l'atenció, la memòria, el llenguatge i el raonament [303,304].

La memòria i l'aprenentatge són dos processos íntimament relacionats. L'aprenentatge és el procés pel qual adquirim el coneixement, mentre que la memòria és el procés on el coneixement és codificat, emmagatzemat, consolidat i posteriorment recuperat. Ambdós processos s'integren en diferents àrees cerebrals entre les que destaquen el còrtex i l'hipocamp [305,306].

La plasticitat sinàptica, també coneguda com a neuroplasticitat, és la capacitat del CNS per recuperar-se i reestructurar-se, i té un paper molt important en la memòria i l'aprenentatge. És un procés complex pel qual les neurones es regeneren tant anatòmicament com funcionalment i es formen noves connexions sinàptiques per tal d'adaptar-se a nous entorns i reduir les alteracions produïdes per trastorns, lesions o patologies [307].

BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) és una neurotrofina amb un paper molt important en la supervivència i el creixement neuronal. Estimula la plasticitat sinàptica a través de molècules com la sinapsina 1 (SYN1, *synapsin 1*), GAP-43 (*growth associated protein*) i CREB [308].

Així, BDNF indueix la fosforilació de SYN1 que modula l'alliberament de neurotransmissors a través de l'exocitosi de les vesícules sinàptiques. També promou el creixement axonal i ajuda a mantenir el contacte sinàptic. Pel que fa a GAP-43, aquest es troba en els terminals axonals i té un paper important en el creixement axonal, l'alliberament de neurotransmissors i en la memòria i l'aprenentatge. BDNF també promou la fosforilació de CREB, el qual és un factor de transcripció especialment important en els processos de memòria espacial i a llarg termini [102,309].

Per altra banda, també s'ha observat que BDNF estimula la neurogènesi, és a dir, la capacitat per generar noves neurones en l'edat adulta [309]. La neurogènesi té lloc principalment en el gir dentat (DG, *dentate gyrus*) de l'hipocamp i contribueix significativament en els processos d'aprenentatge i memòria [306,310].

## 6.2. Dèficit cognitiu

El dèficit cognitiu és la pèrdua de les funcions intel·lectuals com ara el pensament, el raonament i la memòria. Pacients amb disfunció cognitiva presenten alteracions en la memòria, disminució de les habilitats per planificar i solucionar problemes i reducció de la flexibilitat mental [311,312].

Aquestes alteracions cognitives poden excedir-se del que s'espera per l'edat però sense interferir en les activitats quotidianes (estat que s'anomena *mild-cognitive impairment*), o poden ser dèficits tan severs que dificulten la realització de les activitats quotidianes, desenvolupant així un estat de demència [313,314]. La malaltia de l'Alzheimer és la forma més comú de demència que afecta a la gent d'edat avançada. És un desordre neurològic progressiu, degeneratiu i irreversible que causa deteriorament de la memòria, dèficit cognitiu i canvis de comportament en la vellesa [315].

Durant dècades s'ha hipotetitzat que la neurodegeneració era principalment causada per l'acumulació de plaques de  $\beta$ -amiloide i cabdells neurofibrilars (NFT, *neurofibrillary tangles*), majoritàriament en el còrtex i en el hipocamp [315]. Les plaques de  $\beta$ -amiloide són dipòsits extracel·lulars de  $\beta$ -amiloide, el producte proteolític de la proteïna precursora d'amiloide (APP, *amiloide precursor protein*), envoltats per neurites distròfiques i astròcits i microglia reactius. Els NFT són agregats intracel·lulars formats per la forma hiperfosforilada de la proteïna Tau que es troba associada als microtúbuls [314].

No obstant, recents estudis preclínic i en humans suggereixen que la neurodegeneració podria desenvolupar-se com a conseqüència d'alteracions metabòliques, com ara la resistència a la insulina, la qual podria induir l'estrès oxidatiu i la inflamació. De fet, s'ha suggerit que la malaltia de l'Alzheimer podria ser una malaltia metabòlica degenerativa, i fins i tot alguns autors l'han anomenat diabetis tipus III [315,316].

## 6.3. Dèficit cognitiu i alteracions metabòliques

Hi ha un interès emergent per elucidar els mecanismes pels quals alteracions metabòliques poden induir un dèficit cognitiu. En aquest sentit, diversos grups d'investigació han estudiat els efectes de malalties metabòliques com l'obesitat i la diabetis en el cervell [317–319].

Estudis epidemiològics han observat que pacients amb diabetis tipus 1 i 2 presentaven un risc molt més elevat a patir alteracions cognitives, les quals poden progressar a malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer [320–322].

De la mateixa manera, també hi ha una creixent evidència que suggereix que l'increment de la ingesta calòrica així com la ingesta de dietes riques en greixos i sucres podrien estar relacionats amb l'aparició de malalties neurodegeneratives [3,4,309,323].

Així, diversos estudis han associat el consum de sucres amb un dèficit cognitiu tant en adults [324,325] com en nens [326]. A més, models animals que consumien dietes amb un alt contingut de sucres i/o greixos també presentaven alteracions en la memòria i l'aprenentatge [102,327,328].

A continuació s'exposaran els principals mecanismes proposats que relacionen la ingesta de dietes riques en greixos i sucres amb el dèficit cognitiu.

### 6.3.1. Canvis en la plasticitat sinàptica

S'ha observat que dietes riques en greixos i sucres poden reduir la plasticitat sinàptica a través de la disminució de l'expressió de BDNF. De la mateixa manera, proteïnes que depenen de la seva senyalització com SYN1, GAP-43 i CREB també s'han vist reduïdes proporcionalment [102]. A més, aquesta alteració dels nivells de neurotrofines s'ha correlacionat amb un dèficit de memòria espacial (gràcies a la realització de diferents tests cognitius), una reducció de la densitat de l'espina dendrítica i una disminució de LTP (*long term potentiation*) [309,328].

També s'ha observat que canvis en la funció cognitiva anaven acompanyats d'una reducció de l'expressió de sinaptofisina (SYP, *synaptophysin*) i de SYN1, proteïnes associades a la plasticitat sinàptica [329].

No obstant, encara no s'ha elucidat per quin mecanisme les dietes riques en energia poden produir una disminució dels nivells de BDNF. Molteni i col. [330] proposen que la formació de ROS podria tenir un paper important en els canvis de BDNF i la disfunció cognitiva. Altres estudis suggereixen que la disminució de BDNF podria ser deguda a citocines inflamatòries [331].

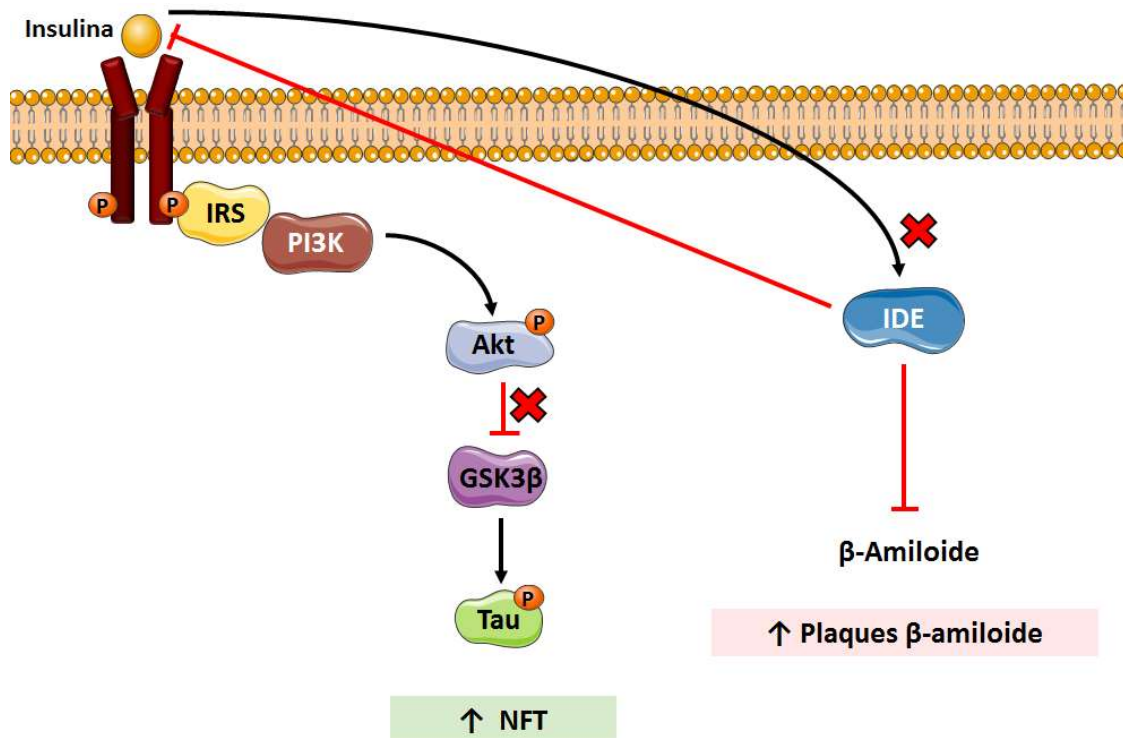
### 6.3.2. Resistència a la insulina

En el cervell, la insulina no només controla el metabolisme glucídic i lipídic sinó que també té un paper molt important en la memòria i l'aprenentatge, ja que regula la plasticitat sinàptica i promou la supervivència i el creixement neuronal [316,332].

La insulina, a través de l'activació de la via PI3K/Akt, promou la inactivació de GSK3 $\beta$ , la qual inhibeix la fosforilació de Tau, una proteïna del citoesquelet neuronal responsable de la polimerització i l'estabilització dels microtúbuls. En un estat de resistència a la insulina, s'activa GSK3 $\beta$ , s'indueix la hiperfosforilació de la proteïna Tau i com a conseqüència la formació de NFT, fet que pot conduir al desenvolupament d'una disfunció cognitiva [315,316] (Figura II-22).

Per altra banda, la resistència a la insulina també s'ha relacionat amb l'increment de la deposició de  $\beta$ -amiloide. Així, s'ha proposat que la insulina pot promoure l'activitat d'IDE

(*insulin-degrading enzyme*) [333,334]. IDE és una  $Zn^{2+}$ -metaloproteasa que degrada i inactiva diferents pèptids bioactius com ara la insulina, la  $\beta$ -amiloide, l'amilina i el glucagó per tal de prevenir la formació d'agregats peptídics [335]. No obstant, s'ha observat que, en un estat de resistència a la insulina, l'activitat d'IDE disminueix i que, com a conseqüència, s'incrementen els nivells de  $\beta$ -amiloide que poden causar un deteriorament cognitiu [328,336]. Igualment, tant en pacients amb la malaltia de l'Alzheimer com en models murins s'ha detectat una reducció de l'activitat d'IDE [337,338].



**Figura II-22.** Mecanismes de resistència a la insulina implicats en les funcions cognitives.

D'aquesta manera, un estat de resistència a la insulina pot induir un augment de la producció de  $\beta$ -amiloide i a un increment de la fosforilació de Tau, alteracions característiques dels processos neurodegeneratius. A més, l'administració d'insulina exògena indueix a una millora de la memòria en pacients amb Alzheimer, fet que corrobora la importància de la resistència a la insulina en el deteriorament cognitiu i l'alteració de la memòria [339].

Així, considerant que hi ha una forta evidència que demostra que la ingesta de greixos i sucres pot induir la resistència a la insulina, aquesta esdevé un dels principals mecanismes que s'ha associat amb el dèficit cognitiu induït per la dieta. De fet, diferents estudis en models murins han demostrat que les dietes riques en greixos i sucres indueixen a una resistència a la insulina en el cervell, a través de la reducció de la fosforilació de proteïnes de la via de senyalització de la insulina com IR o Akt [340,341]. A més, aquesta resistència s'ha associat a una alteració de la memòria, observada a través dels resultats de la

realització de tests cognitius, així com mitjançant la disminució de proteïnes importants per la sinapsi [328,329].

### 6.3.3. Inflamació

La inflamació s'ha correlacionat amb el dèficit cognitiu i la neurodegeneració [308,309]. Les citocines proinflamàtores, com ara IL-1, IL-6, MCP1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) i TNF $\alpha$ , entre d'altres, promouen la resposta inflamatòria tant a nivell sistèmic com cerebral. Aquestes citocines poden travessar la BBB o bé produir-se en el parènquima cerebral específicament per cèl·lules de la microglia, astròcits o cèl·lules endotelials de la BBB [342].

S'ha observat que les citocines proinflamàtores tenen un efecte perjudicial directe sobre la memòria i l'aprenentatge. S'ha demostrat, per exemple, que la injecció d'IL-1 $\beta$  tant a nivell sistèmic com intraventricular condueix a un deteriorament de la memòria espacial en rates [343,344], així com a una reducció dels nivells de BDNF [331].

És àmpliament acceptat que la ingesta de dietes riques en greixos i sucres incrementa la resposta inflamatòria. D'aquesta manera, es postula que la seva ingesta podria afectar negativament el procés cognitiu [3]. En aquest sentit, s'ha observat que individus que pateixen síndrome metabòlica amb un augment de la inflamació presenten un dèficit cognitiu més pronunciat que aquells amb uns baixos nivells d'inflamació [345]. Pel que fa a estudis preclínic, Calvo-Ochoa i col. [346] van obtenir que rates alimentades amb una dieta rica en greixos i HFCS durant tan sols una setmana, ja presentaven un increment significatiu del nombre i la mida d'astròcits, així com un lleuger augment de les cèl·lules de la microglia en l'hipocamp. Per altra banda, Pistelli i col. [347] van demostrar que l'administració d'una dieta rica en greixos (60%) en ratolins produïa un increment de les citocines TNF $\alpha$ , MCP1 i IL-6 en el còrtex, així com una alteració en la realització de tests cognitius i una disminució dels nivells de BDNF.

### 6.3.4. Estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu apareix quan hi ha un desequilibri entre la producció de ROS i els mecanismes de defensa antioxidant de la cèl·lula. Així, un increment excessiu de la producció de ROS juntament amb una disminució de l'activitat dels enzims antioxidants com SOD (*superoxide dismutase*), GPX (*glutathione peroxidase*) i CAT (*catalase*) en el cervell, podria danyar l'estructura i la funció de proteïnes i altres components cel·lulars, provocant una degeneració neuronal i alteracions en la funció cognitiva com la memòria i l'aprenentatge [348,349]. A més, cal considerar que el cervell és un òrgan molt susceptible a patir peroxidació lipídica degut a l'alta concentració d'àcids poliinsaturats que presenta [316].



Per altra banda, la hiperglicèmia, ja sigui causada per una menor producció d'insulina o un dèficit de la seva senyalització, pot produir l'acumulació d'AGEs que indueixen a la generació de ROS i al dany cel·lular [316]. A més, s'ha observat que els AGEs també poden promoure la formació d'agregats de  $\beta$ -amiloide [350] així com la glicació de proteïnes Tau [351], induint als processos neurodegeneratius.

L'estrès oxidatiu és present en malalties com la diabetis i l'Alzheimer, i també s'ha associat a la disfunció cognitiva induïda per la dieta [342]. Diversos estudis donen suport a aquesta teoria. Per exemple, Wu i col. [352] van observar que la ingesta d'una dieta rica en greixos induïa estrès oxidatiu, una pitjor realització dels tests cognitius i una disminució dels nivells de BDNF. En canvi, quan s'administrava un producte antioxidant, concretament vitamina E, aquests efectes es revertien. En la mateixa línia, rates alimentades amb una dieta rica en greixos i carbohidrats durant 6 setmanes presentaven una reducció dels nivells de SOD i un increment de TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*). A més, presentaven un dèficit de la memòria i de l'aprenentatge espacial mesurat a través de diversos tests cognitius. En aquest cas també, l'administració de vitamina A reduïa l'estrès oxidatiu i millorava la realització dels tests [353].

Cal considerar que tant la inflamació com l'estrès oxidatiu poden conduir a un estat de resistència a la insulina que, tal i com s'ha explicat, també pot induir un dèficit en la memòria i l'aprenentatge [3,354].

### 6.3.5. Disfunció mitocondrial

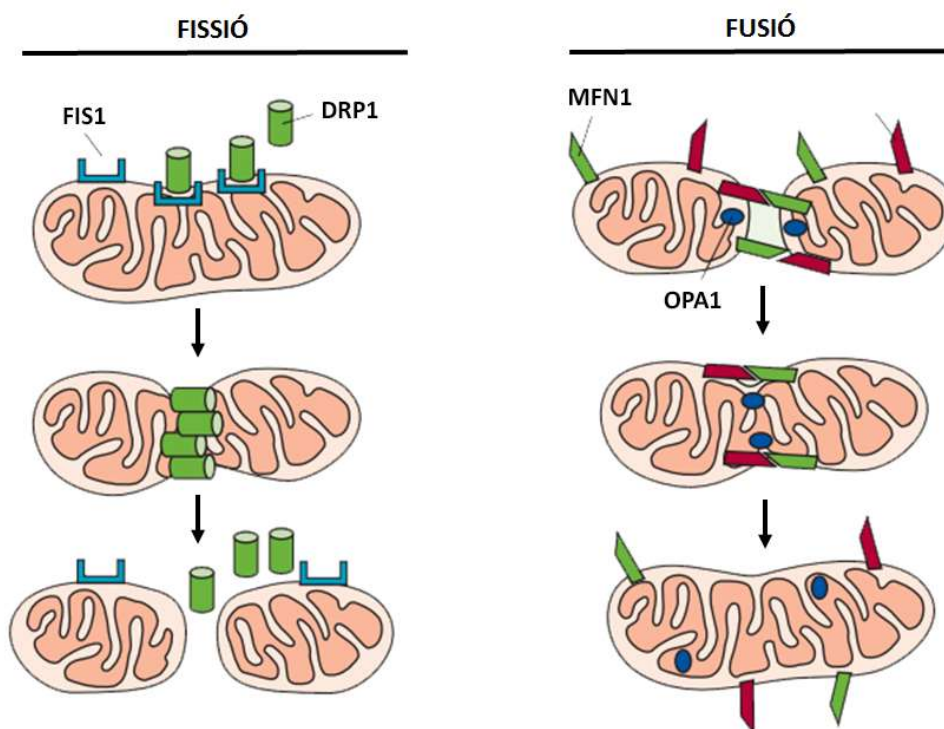
Un altre mecanisme que s'ha associat al dèficit cognitiu com a causa de la ingesta de dietes riques en sucres i greixos ha estat la disfunció mitocondrial.

Els mitocondris són orgànuls altament dinàmics de gran importància en els processos de la respiració cel·lular, la producció d'energia, la producció de ROS i l'apoptosi [355]. La seva biogènesi està controlada pels processos de fusió i fissió que permeten mantenir un equilibri en el balanç energètic de la cèl·lula. Els processos de fusió s'associen amb l'optimització de la funció del mitocondri, ja que promouen un increment de la síntesi d'ATP; mentre que els de fissió amb el manteniment de la capacitat bioenergètica, ja que indueixen a l'eliminació de mitocondris malmesos. Les principals proteïnes involucrades en els processos de fusió són la MFN (*mitofusin*) 1 i 2, i OPA1 (*optic atrophy-1 protein*). La MFN es localitza a la membrana mitocondrial externa, mentre que OPA1 a la membrana interna. Pel que fa al procés de fissió, destaquen les proteïnes DRP1 (*dynamin-related protein 1*) i FIS1 (*fission 1*) [356,357] (Figura II-23).

Un desequilibri entre els processos de fissió i fusió comporta canvis funcionals en els mitocondris, així com un increment de la producció de ROS, de la peroxidació lipídica i una disminució del procés respiratori i de la producció d'ATP [355].

## II. INTRODUCCIÓ

A causa de la limitada capacitat glicolítica que presenten les neurones, aquestes són particularment susceptibles a les alteracions de la funció mitocondrial [358]. Així, hi ha una creixent evidència que suporta la importància de la disfunció mitocondrial en la patogènesi dels desordres neurodegeneratius [359,360]. Diversos estudis [361,362] han demostrat que pacients amb la malaltia de l'Alzheimer presenten una expressió cerebral reduïda de les proteïnes relacionades amb la fusió (OPA1, MFN1 i MFN2), mentre que un augment dels nivells de les proteïnes que controlen els processos de fissió (DRP1 i FIS1).



**Figura II-23.** Processos de fusió i fissió mitocondrial. Adaptada de Hagberg i col. [363].

A més, diversos autors suggereixen que és una alteració que apareix en les fases inicials dels processos que cursen amb un dèficit cognitiu i que està estretament relacionada amb l'estrès oxidatiu [364]. En aquest sentit, s'ha descrit PGC-1 $\alpha$  com un important regulador de la biogènesi mitocondrial així com de la producció de ROS [365,366]. De fet, s'ha observat que en els processos neurodegeneratius l'activitat de PGC-1 $\alpha$  es redueix i, com a conseqüència, disminueix la biogènesi mitocondrial i la detoxificació de ROS [366,367].

Per altra banda, també hi ha evidències que relacionen el desenvolupament de malalties metabòliques així com la ingesta de dietes riques en greixos i sucres amb la disfunció mitocondrial [356,368]. En aquest sentit, diversos estudis indiquen que models animals de diabetis i obesitat suplementats amb dietes riques en greixos i sucres presenten una alteració de la funció mitocondrial [369,370]. A més, en alguns casos aquesta disfunció mitocondrial és observada en el cervell i s'associa amb una resistència a la insulina i un dèficit cognitiu [371,372].

### 6.3.6. Alteració de la permeabilitat de la BBB

La BBB està formada per un endoteli microvascular que limita l'entrada de molts components sanguinis al cervell [373]. Per una banda, alteracions en la BBB s'han estretament correlacionat amb l'aparició d'alteracions cognitives i de malalties neurodegeneratives [374,375], mentre que per l'altra, diferents estudis suggereixen que diversos factors metabòlics i dietètics estan relacionats amb l'alteració de la integritat de la BBB [376,377].

Així, per exemple, Kanoski i col. [378] van demostrar que l'administració de dieta *Western* a rates altera la funció hipocampal, fet que l'associen a un increment de la permeabilitat de la BBB, ja que observen una disminució de l'expressió de proteïnes de les unions estretes.

Per altra banda, s'ha suggerit que les dietes que indueixen l'obesitat i, més concretament l'increment de triglicèrids, promouen una reducció del transport actiu d'hormones com la leptina [379] i la grelina [380] a través de la BBB. Hi ha certes evidències que la leptina podria tenir un paper important en l'aprenentatge dependent d'hipocamp a través de la regulació de la plasticitat sinàptica [381,382]. Per tant, una desregulació del seu transport podria comportar un dèficit cognitiu. No obstant, alguns autors suggereixen que l'alteració de la BBB pot afavorir l'aparició de la resistència a la leptina, però no esdevenir una causa directa del deteriorament cognitiu [383].

També, cal considerar que la inflamació pot alterar la permeabilitat de la BBB [373] i per tant pot esdevenir un altre mecanisme pel qual la ingesta de dietes riques en greixos i sucres pot induir l'alteració de la BBB.

Per tots aquests motius, s'ha postulat que l'alteració de la permeabilitat de la BBB és un altre mecanisme pel qual les dietes riques en greixos i sucres poden reduir la funció cognitiva.

En resum, tot i que són diversos els mecanismes que s'han proposat per explicar com les dietes riques en greixos i en sucres poden contribuir a una disfunció cognitiva, sembla ser que hi ha una evidència creixent de la relació entre la seva ingesta i l'aparició de malalties neurodegeneratives



### **III. HYPOTHESIS AND AIMS**



Our research group has shown in previous studies that female rats supplemented with liquid fructose (10% w/v) for 2 and 8 weeks develop several metabolic alterations such as impaired insulin sensitivity, hypertriglyceridemia and liver steatosis [7,8,10,121].

Dyslipidemia and insulin resistance have been described as cardiovascular disease risk factors. In addition, several studies have suggested that fructose, due to its own metabolism, could impair vascular reactivity [85,88,90]. Thus, we wonder whether subchronic fructose supplementation could induce vascular alterations.

On the other hand, sugar intake usually extends over many years in high sugar consumers. Consequently, chronic fructose supplementation studies will provide a better approach of human consumption patterns. Prolongation of the sugar supplementation period will probably exacerbate metabolic impairments as well as induce other alterations.

Recently, there is a growing evidence of the association between metabolic and neurodegenerative diseases [317,318]. In addition, some studies suggest that consumption of high-fat and high-sugar diets could have an important impact on behavior and cognition [3]. Taking all of this into account, we decided to investigate long term fructose consumption effects in the brain.

Moreover, we aimed to study the effects induced by fructose and glucose intake under equicaloric conditions, in order to be able to discriminate between the alterations due to sugar-specific metabolism and those merely associated to an excessive caloric intake.

Accordingly, the hypothesis of the present thesis is that subchronic fructose intake will produce vascular alterations. Further, chronic supplementation will exacerbate metabolic alterations previously observed in short term studies and will induce other effects such as inflammation, oxidative stress, ER stress and cognitive dysfunction. In addition, it is expected that these deleterious effects will not be merely related to increased caloric consumption but also to specificities in the metabolism of each simple sugar studied.

Consequently, the aims of the present thesis are:

1. To study the metabolic and vascular effects of glucose and fructose intake (20% w/v for 8 weeks) in female rats and to define the molecular mechanisms linking these alterations.
2. To identify the effects of fructose and glucose consumption (10% w/v for 28 weeks) on carbohydrate and lipid metabolism as well as on inflammatory processes and oxidative and ER stress.

### III. HYPOTHESIS AND AIMS

---

3. To investigate the effects of long term fructose and glucose intake (10% w/v for 28 weeks) in the brain, specially on learning and memory cognitive processes, and to identify the main responsible mechanisms.
4. To determine whether these alterations induced by sugar intake are related to specificities of sugar intrinsic metabolism or exclusively to increased calorie consumption.



## **IV. MATERIALS I MÈTODES**



## 1. DISSENY DELS ESTUDIS

### 1.1. Estudi 1

Per a la realització d'aquest estudi, es van utilitzar rates femella Sprague-Dawley (n=42) d'entre 9-11 setmanes d'edat (Simonsen Laboratories). Els animals es van mantenir estabulats a l'estabulari de l'School of Pharmacy, University of the Pacific en unes condicions d'humitat i temperatura constants, amb un cicle de llum/fosc de 12 h i amb accés lliure al menjar i a la beguda.

Després d'una setmana d'aclimatació, els animals es van distribuir en 3 grups: el grup control, el grup glucosa i el grup fructosa. Al grup control se'ls hi va proporcionar aigua com a beguda mentre que el grup glucosa i el grup fructosa van ser suplementats amb una solució al 20% p/v de glucosa (Sigma-Aldrich) i fructosa (Sigma-Aldrich) en l'aigua de beguda, respectivament. Tots els grups van ser alimentats amb una dieta sòlida estàndard (5001, Labdiet). La durada de l'estudi va ser de 8 setmanes, durant el qual es va controlar periòdicament la ingesta de beguda i de menjar així com el pes corporal.

Passades les 8 setmanes, els animals es van deixar 12 h en dejú i van ser eutanasiats mitjançant l'ús de CO<sub>2</sub>. A continuació, es varen obtenir mostres de sang, a través d'una punció cardíaca, així com de diferents teixits: aorta, fetge i teixit adipós visceral. També es va mesurar la longitud del fèmur.

Pel que fa a l'artèria aorta, es va extreure el tram toràctic i es va col·locar immediatament en una placa que contenia solució de Krebs a 4°C (Taula IV-1). Seguidament, amb l'ajuda d'un microscopi es va netejar el teixit adipós i connectiu que envoltava l'artèria. Les aortes d'alguns animals (n=8) es van destinar als estudis de reactivitat vascular, mentre que les dels altres (n=6) es van utilitzar per a l'obtenció d'extractes de proteïna i RNA.

Reactiu	Concentració
NaCl (Sigma-Aldrich)	119 mM
KCl (Sigma-Aldrich)	4.7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma-Aldrich)	1.18 mM
MgSO <sub>4</sub> (Sigma-Aldrich)	1.2 mM
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma-Aldrich)	24.9 mM
EDTA (Sigma-Aldrich)	0.023 mM
CaCl <sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)	1.6 mM
Glucosa (Sigma-Aldrich)	6.0 mM

**Taula IV-1.** Reactius i concentracions utilitzades per la preparació de la solució de Krebs.

El fetge i el teixit adipós es van pesar i se'n van separar diferents porcions per l'extracció de proteïna i RNA. En el cas del fetge, un cop extreta una part per a l'RNA, es va perfondre amb NaCl 0.9% (p/v) i es van obtenir diferents porcions per a l'extracció posterior de proteïna. Sempre es va procurar prendre mostres dels mateixos lòbuls per a cada tipus d'extracció.

Les mostres destinades a l'extracció de proteïna i d'RNA van ser col·lectades, immediatament congelades en neu carbònica i posteriorment emmagatzemades a -80°C fins el seu ús.

Tots els procediments van ser aprovats per *Animal Care Committee* de la *University of the Pacific* i compleixen tots els requisits establerts en la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* [384].

### 1.2. Estudi 2

Per a aquest estudi, es van utilitzar rates femella Sprague-Dawley (n=36) de 8 setmanes d'edat (Charles River). Els animals es van mantenir estabulats a l'estabulari de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona en unes condicions d'humitat i temperatura constants, amb un cicle de llum/fosc de 12 h i amb accés lliure al menjar i a la beguda.

Després d'un període d'aclimatació de dues setmanes, de la mateixa manera que en l'estudi 1, els animals van ser distribuïts en tres grups d'estudi: control, glucosa i fructosa. En aquest cas, el grup fructosa es va suplementar amb una solució al 10% de p/v de fructosa (AppliChem) en l'aigua de beguda, mentre que la concentració de la solució de glucosa (AppliChem) es va ajustar periòdicament perquè el consum calòric total fos equivalent al del grup fructosa. Tots els animals van ser alimentats amb una dieta estàndard (Harlan® 2014). La durada de l'estudi va ser de 28 setmanes, durant el qual es va controlar la ingesta de beguda i de menjar, així com el pes corporal.

Per tal d'avaluar l'efecte de la ingesta de sucres en la memòria i l'estat cognitiu dels animals, es van realitzar dos tests: el *Morris water maze* i el *novel object recognition test*. Es dugueren a terme a l'inici (2-3 setmanes després d'iniciar la suplementació de sucres) i al final (27-28 setmanes després d'iniciar la suplementació de sucres) per conèixer els efectes d'una suplementació de sucres a curt i a llarg termini. Abans de finalitzar l'estudi, també es va realitzar un test de tolerància a la glucosa. Aquests procediments seran detallats en els següents apartats.

Passades les 28 setmanes, els animals es van deixar 12 h en dejú i van ser anestesiats amb una dosi combinada de 9 mg de ketamina (Imalgene, Merial) i 40 µg de xilacina (Rompun®, Bayer) per cada 100 g de pes i posteriorment sacrificats per decapitació.

Per cada grup, es van destinar aleatòriament 8 rates per l'extracció de sang i de diferents òrgans, mentre que 4 d'elles es van perfondre amb una solució de paraformaldehid per poder valorar alteracions en el cervell utilitzant tècniques d'immunohistoquímica.

L'extracció de sang es va realitzar mitjançant una punció cardíaca i es van extreure diferents òrgans: fetge, teixit adipós visceral, múscul esquelètic (múscul tibial i soleus), còrtex prefrontal, hipotàlem i hipocamp. El fetge i el teixit adipós es van pesar i també es va mesurar la longitud del fèmur.

Pel que fa al fetge, de la mateixa manera que l'estudi 1, es va prendre una porció per l'extracció d'RNA i unes altres per l'extracció de proteïna, prèvia perfusió amb NaCl 0.9% (p/v). En aquest cas però, també es van prendre porcions per a l'obtenció de sobrenedant post-nuclear i per a la valoració histopatològica de la necrosi, la fibrosi i l'esteatosi hepàtica.

Les mostres destinades a l'extracció de proteïna i d'RNA van ser col·lectades, congelades immediatament amb nitrogen líquid i posteriorment emmagatzemades a -80°C fins el seu ús.

Per a la realització de la perfusió i posterior obtenció de mostres cerebrals per a immunohistoquímica, es va administrar en el ventricle esquerre 200 mL d'una solució de tampó fosfat (PB, *phosphate buffer*) 0.1 M (14 g/L de  $K_2HPO_4$ , 2.65 g/L  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ) que contenia 1 g/L de procaïna (Sigma-Aldrich) i 1000 U/L d'heparina (Rovi). Immediatament, es va realitzar una incisió en l'aurícula dreta per tal d'afavorir una obertura del sistema circulatori. L'administració d'aquesta solució permet netejar els vasos sanguinis a la vegada que es prevé la formació de coàguls. Seguidament, es va administrar 200 mL d'una solució del 4% de paraformaldehid (Scharlau) en PB 0.1 M. Una vegada finalitzada la perfusió, es va prosseguir amb l'extracció del cervells, els quals van ser post-fixats en la mateixa solució de perfusió durant 24 h a 4°C. Per tal de crioprotegir les mostres, durant les següents 24 h es van conservar amb una solució de paraformaldehid al 4% amb un 30% de sacarosa (Panreac). Finalment, es van congelar en sec a -80°C fins el seu ús.

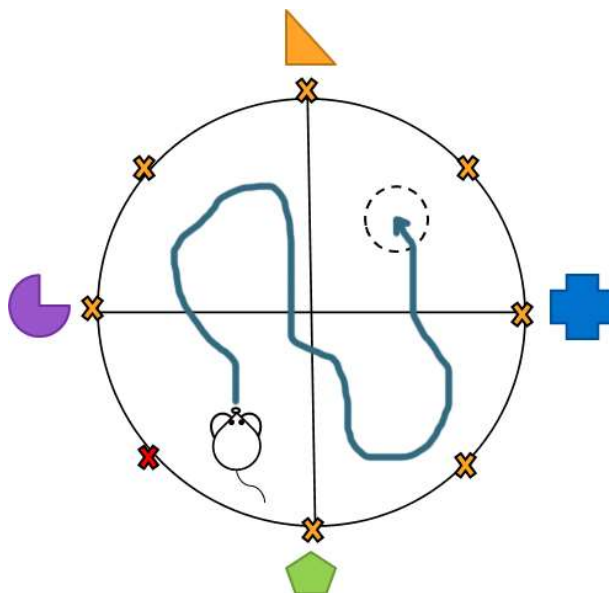
Tots els procediments es van realitzar segons les pautes descrites pel Comitè de Bioètica de la Universitat de Barcelona, tal i com s'ha establert a la Llei 5/1995 (21 de juliol) de la Generalitat de Catalunya.

## 2. TESTS COGNITIUS

### 2.1. Test del laberint d'aigua: *Morris water maze*

El test del laberint d'aigua conegut com a *Morris water maze* (MWM) és un test dissenyat especialment per rosegadors amb l'objectiu d'avaluar i estudiar l'aprenentatge i la memòria espacial. Consisteix en la localització d'una plataforma submergida en una piscina,

a través de diferents objectes de referència. L'aprenentatge és avaluat a través de la repetició de diferents proves experimentals, mentre que la memòria de referència és determinada per la preferència de l'àrea de la plataforma quan la plataforma és absent [385] (Figura IV-1).



**Figura IV-1.** Representació gràfica del test de *Morris water maze*.

Es realitzà en una piscina circular de 160 cm de diàmetre i 45 cm d'alçada, la qual contenia aigua a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  fins a un altura de 25 cm. La piscina estava dividida en quatre quadrants imaginaris diferenciats pels quatre punts cardinals. En cada punt cardinal, es va col·locar un objecte voluminós i ben diferenciat de la resta. En el centre d'un d'aquests quadrants es va situar una plataforma d'11 cm de diàmetre, submergida 1 cm en l'aigua. L'aigua contenia una solució de làtex no tòxica, que li proporcionava opacitat de manera que la plataforma no fos visible per les rates. Tot el conjunt va romandre aïllat mitjançant unes cortines negres per tal de minimitzar qualsevol pista de la sala que pogués servir d'orientació.

La fase d'aprenentatge va consistir en 4 proves experimentals per dia durant 6 dies consecutius. El punt d'inici de cada prova era determinat semi-aleatòriament, de manera que l'animal no podia aprendre un recorregut específic per arribar a la plataforma. A més, no s'utilitzà la posició més distant de la plataforma, ja que es reservà en exclusiva pel dia del test. Les rates eren situades en l'aigua, de cara a la paret de la piscina, i se'ls hi proporcionava 90 s per tal de que lliurement trobessin la plataforma. Si passats aquests 90 s no localitzaven la plataforma, els animals eren guiats o situats sobre la plataforma, on romanien durant 30 s amb l'objectiu de que poguessin memoritzar la seva ubicació. Així, es va mesurar el temps de latència fins a trobar la plataforma i també la velocitat de natació.

Passades 24 h de la fase d'aprenentatge, es va realitzar el test de memòria, en el qual es va retirar la plataforma de la piscina. Els animals es van situar en la piscina des del punt més allunyat de la plataforma, on hi van romandre durant 90 s. Es van analitzar diferents

paràmetres com el temps que estaven en cada quadrant i en la zona on hauria d'estar la plataforma així com el número d'entrades al quadrant i el temps de latència al objectiu.

El recorregut de cada animal va ser enregistrat a través d'una càmera situada sobre el centre de la piscina i els resultats van ser analitzats mitjançant un *software* apropiat (Smart 3.0, Panlab).

Cal comentar que la ubicació de la plataforma va ser diferent en la realització del test de l'inici i del final de l'estudi, per tal d'evitar que en el segon test hi haguessin interferències pel possible aprenentatge adquirit en el primer.

## **2.2. Test de reconeixement d'objectes: *Novel object recognition test***

El test de reconeixement d'objectes, anomenat *Novel object recognition test* (NORT), avalua la memòria d'animals, principalment rosegadors, basant-se en la preferència que presenten per explorar objectes nous respecte a aquells que els hi resulten familiars [386].

Per a la realització del test, s'utilitzà una caixa de 30x70x70 cm, la qual després de cada test era degudament netejada amb etanol per evitar qualsevol interferència que pogués romandre de l'animal anterior. El test consisteix en tres fases: aclimatació, familiarització i el propi test (Figura IV-2).

En la fase d'aclimatació, es va introduir l'animal dins la caixa i durant 10 min se'l va deixar explorar lliurement tot l'espai sense la presència de cap objecte, el que s'anomena l'exploració del camp obert (*open-field*). Aquesta fase es va realitzar durant dos dies consecutius.

Al dia següent, es va realitzar la fase de familiarització, on l'animal es va deixar durant 10 minuts a l'interior de la caixa que contenia dos objectes idèntics (A + A), col·locats simètricament i amb suficient espai al voltant per tal de que l'animal els pogués explorar lliurement.

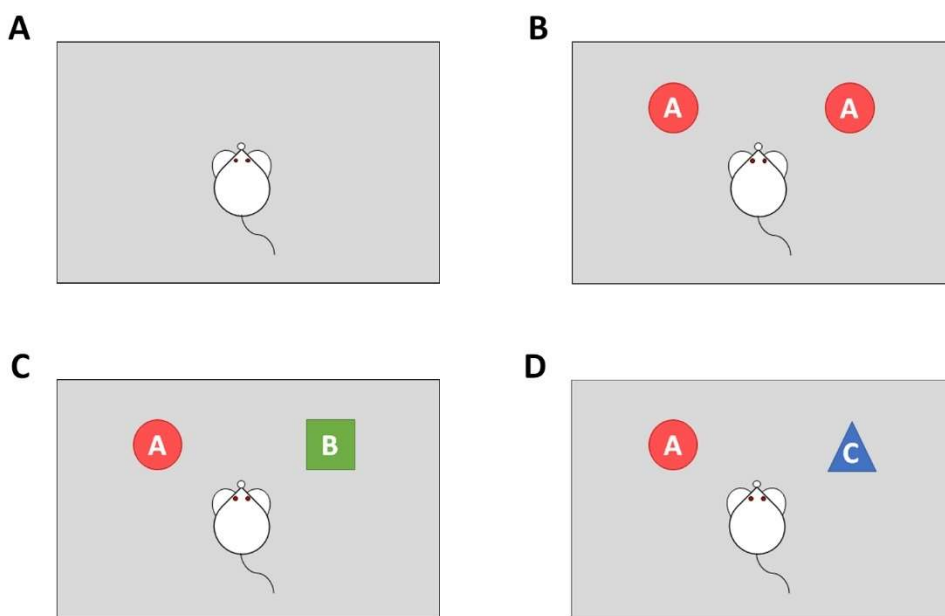
Passades 2 h de la fase de familiarització, es va dur a terme el test que permet estudiar la memòria a curt termini. Així, es va substituir un dels objectes de la familiarització (A) per un nou objecte (B). Les rates es van deixar de nou dins la caixa durant 10 min per a què poguessin explorar lliurement els objectes.

Passades 24 h de la fase de familiarització, es va realitzar el test que permet estudiar la memòria a llarg termini. Es va mantenir l'objecte de la fase de familiarització (A) i es va substituir l'objecte del test a 2 h (B) per un segon nou objecte (C). Novament, es va deixar l'animal 10 min a l'interior de la caixa.

Tots els procediments van ser enregistrats per una càmera situada sobre la caixa. Un cop realitzats tots els tests, es va prosseguir a l'anàlisi dels vídeos en el qual es va calcular el temps d'exploració de cada rata en l'objecte nou ( $T_N$ ) i en l'objecte familiar ( $T_F$ ). A partir

d'aquests valors es va calcular l'índex discriminatori (DI, *discrimination index*) definit com a  $(T_N - T_F) / (T_N + T_F)$ , per permetre valorar la memòria de cada animal.

És important remarcar que es va considerar exploració quan l'animal estava orientat cap a l'objecte, a una distància  $\leq 1$  cm, i/o presentava activament signes d'ensumar, mentre que no es va comptabilitzar com a exploració quan l'animal s'enfilava o seia sobre l'objecte. L'anàlisi d'aquests vídeos es va realitzar amb la col·laboració del grup de Recerca d'Envel·liment i Neurodegeneració dirigit per la Dra. Mercè Pallàs de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.



**Figura IV-2.** Representació gràfica de les diferents fases del *Novel object recognition test*: fase d'aclimatació (A), fase de familiarització (B) i el test a 2 h (C) i a 24 h (D).

### 3. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA I CORBA D'INSULINA

El test de tolerància a la glucosa (GTT, *glucose tolerance test*) consisteix en l'avaluació de la resposta de l'animal a una administració d'una quantitat important de glucosa.

Es va realitzar tres setmanes abans de finalitzar l'estudi 2. Després de deixar els animals 6 h en dejú, se'ls administrà per via intraperitoneal 2 g de glucosa/kg de pes corporal, mitjançant una solució que contenia 0.4 g de glucosa/mL de NaCl 0.9% (p/v).

Als 0, 15, 30, 60, 90 i 120 min després de l'administració de glucosa, es va determinar la concentració de glucosa plasmàtica, mentre que als 0, 15 i 120 min es van mesurar també els nivells d'insulina en plasma. La sang es va obtenir a partir d'un petit tall en la cua dels animals. El procediment realitzat per determinar la concentració de glucosa i d'insulina plasmàtica seran detallats en els següents apartats.



#### **4. DETERMINACIÓ DE LES CONCENTRACIONS DE GLUCOSA, TRIGLICÈRIDS I COLESTEROL EN SANG**

L'anàlisi de les concentracions de glucosa, triglicèrids i colesterol en sang es va dur a terme mitjançant l'ús del glucòmetre *Accutrend® Plus* (Roche Farma). La sang s'obtenia a partir d'un petit tall realitzat a la cua de l'animal que permetia obtenir una gota que es dipositava sobre les tires reactives corresponents:

- Glucosa: *Accutrend* Glucose; ref. 11447475 (Roche Farma)
- Triglicèrids: *Accutrend* Triglycerides; ref. 11538144 (Roche Farma)
- Colesterol: *Accutrend* Cholesterol; ref. 11418262 (Roche Farma)

Les determinacions es van realitzar moments abans del sacrifici, després de 12 hores de dejú, excepte en el cas de la determinació dels triglicèrids postprandials que es va realitzar, després de 2 h de dejú, uns dies abans de finalitzar l'estudi 2.

#### **5. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES PLASMÀTICS**

##### **5.1. Obtenció de plasma**

Al dia del sacrifici, la sang obtinguda per punció cardíaca es va recollir en tubs que contenien heparina (Sigma-Aldrich) (estudi 1) o bé en tubs col·lectors específics (*Micro tube 1.1 mL Z-Gel*, Sarstedt) (estudi 2). Seguidament, els tubs es van centrifugar a 10,000 xg durant 5 min a temperatura ambient i es va extreure el sobrenedant per tal d'obtenir el plasma. Aquest es va aliquotar i emmagatzemar a -80°C fins a seu ús.

##### **5.2. Assajos immunoenzimàtics: ELISA**

La determinació de les concentracions plasmàtiques d'insulina, leptina, adiponectina, i AGEs es va realitzar mitjançant la tècnica ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). És una tècnica d'assaig immunoenzimàtic, descrita per Engvall [387] que permet la detecció tant d'antígens com d'anticossos. Es basa en la detecció del reconeixement antígen-anticòs mitjançant l'activitat colorimètrica produïda per un enzim unit a un dels immunoreactius. Hi ha diferents tipus d'ELISA, entre els que destaquen el directe, l'indirecte i el *sandwich*.

A continuació, es detallen les referències dels diferents ELISAs comercials que es van utilitzar:

- Estudi 1:
  - Insulina: A05105 (Spi Bio)
  - Leptina: KRC2281 (Invitrogen)
  - Adiponectina: AG-45A-0005EK-KI01 (Adipogen)

- Estudi 2
  - Insulina: EZRMI-13K (Millipore)
  - Leptina: EZRL-83K (Millipore)
  - Adiponectina: EZRADP-62K (Millipore)
  - AGEs: MBS261131 (MyBioSource)

En tots els casos, es va prosseguir segons les instruccions del fabricant.

### 5.3. Kits enzimàtics colorimètrics

La concentració d'àcid úric, alanina transaminasa (ALT, *alanine transaminase*), NEFAs i TBARS es va determinar mitjançant l'ús de kits enzimàtics colorimètrics i seguint les indicacions establertes pel fabricant. A continuació, s'especifica cada kit utilitzat així com el principi en què es basa.

#### 5.3.1. Àcid úric

La quantificació de la concentració d'àcid úric en plasma es va realitzar mitjançant el kit 41000 *Uric Acid* (Spinreact). Aquest es basa en la inducció de l'oxidació de l'àcid úric de la mostra a través de l'addició de l'enzim uricasa. En aquesta reacció es produeix peròxid d'hidrogen, el qual es fa reaccionar amb un conjunt de compostos que donen lloc a un compost de color vermell. Així, mitjançant un espectrofotòmetre es mesura la intensitat del color vermell de la mostra, la qual és proporcional a la concentració d'àcid úric.

#### 5.3.2. Alanina transaminasa (ALT)

Per a la determinació d'ALT també coneguda com a transaminasa glutàmic-pirúvica, s'utilitzà el kit enzimàtic 1001170 GPT/ALT (Spinreact). En aquest kit es propicia que ALT catalitzi la transferència d'un grup amino de l'alanina a l' $\alpha$ -cetoglutarat donant lloc a glutamat i piruvat. Seguidament, el piruvat format és reduït a lactat gràcies a l'acció de la lactat deshidrogenasa i de NADH. D'aquesta manera, la concentració d'ALT en la mostra és proporcional a la velocitat de disminució de la concentració de NADH en el medi. A través de la lectura de l'absorbància a 340 nm a cada minut durant 3 minuts, es calculà la disminució de l'absorbància per minut ( $\Delta A/\text{min}$ ) que va permetre obtenir la concentració d'ALT.

#### 5.3.3. Àcids grassos no esterificats (NEFAs)

La determinació de la concentració de NEFAs es va realitzar mitjançant l'ús del kit 5620-01 (Bioo Scientific). Aquest kit es basa en la reacció dels NEFAs (presentes en el plasma) amb ATP, el Coenzim A i l'enzim acil-CoA sintetasa per tal de formar acil-CoA. L'acil-CoA obtingut és posteriorment oxidat donant lloc a la formació de peròxid d'hidrogen. Aquest, a través

de la reacció amb diferents compostos, dóna lloc a la formació d'un nou compost de color lila. Així, es mesura mitjançant l'espectrofotòmetre la intensitat del color d'aquest producte que és directament proporcional a la concentració de NEFAs en plasma.

#### **5.3.4. Substàncies reactives de l'àcid Tiobarbitúric (TBARS)**

La determinació de la concentració de TBARS és un mètode establert per quantificar la peroxidació lipídica. Els nivells de TBARS en plasma es van mesurar a través del kit 10009055 (Cayman Chemical), el qual es basa en la determinació de la concentració de malonaldehid, un dels principals productes formats en la peroxidació lipídica. El malonaldehid present en el plasma es fa reaccionar amb àcid tiobarbitúric en unes condicions d'altres temperatures i d'acidesa, donant lloc a la formació d'un adducte colorejat. La determinació de la formació d'aquest adducte mitjançant la seva coloració proporcionarà de manera directa els nivells de peroxidació lipídica de la mostra.

## **6. DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE TRIGLICÈRIDS I COLESTEROL EN TEIXIT**

Per a la determinació del contingut de triglicèrids i colesterol en teixit, en primer lloc, es van extreure els lípids mitjançant el protocol descrit per Qu i col. [388]. Es van pesar uns 40 mg de teixit hepàtic i muscular congelat i es van homogenitzar en 800 µL d'acetona mitjançant un homogenitzador Polytron® PT 1200E. Seguidament, l'homogenat es va incubar en rotació constant a temperatura ambient durant tota la nit. Passat aquest temps, les mostres es van deixar reposar durant 15 min per permetre la sedimentació de les restes de teixit, obtenint així els lípids extrets en la solució d'acetona.

A partir d'aquest extracte es va determinar la concentració de triglicèrids hepàtics i musculars mitjançant el kit colorimètric 41030 Triglycerides (Spinreact) i la concentració de colesterol en teixit hepàtic mitjançant el kit colorimètric 1001090 Cholesterol (Spinreact). Aquests kits es basen en la reacció de l'analit amb uns components específics que dóna lloc a la formació de quinones amb coloració. El valor de la seva absorbància, mesurat mitjançant un espectrofotòmetre, és proporcional als nivells de triglicèrids i colesterol de la mostra.

## **7. ESTUDI DE LA REACTIVITAT VASCULAR**

### **7.1. Preparació dels anells aòrtics**

Per a l'estudi de la reactivitat vascular, es van utilitzar les aortes toràciques extretes en l'estudi 1. Després de netejar el teixit adipós i connectiu que les envoltava, es van tallar en anells d'exactament 2 mm. Els anells es van suspendre horitzontalment en banys d'òrgans

individuals mitjançant la introducció de dos filferros d'acer inoxidable per la llum arterial. Cada bany contenia 20 mL de solució de Krebs (Taula IV-1) a 37°C i contínuament oxigenada amb gas carbogen (95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>). La tensió isomètrica va ser mesurada per un transductor i enregistrada a través d'un sistema d'adquisició de dades (PowerLab, ADInstruments).

Amb l'objectiu d'obtenir un to basal estable, cada preparació es va deixar equilibrar durant 40 min a una tensió d'1 g. Seguidament, els anells es van estimular dues vegades, deixant 20 min de diferència entre elles, amb KCl (Sigma-Aldrich) a una concentració de 80 mM, fins que s'assolia la màxima contracció.

Cal comentar que durant la preparació dels anells aòrtics es va mantenir la màxima precaució per tal de preservar l'endoteli. A més, la viabilitat dels endotelis es va mesurar a través de la vasodilatació produïda per una concentració de 10 µM d'Ach en anells aòrtics precontrets amb una concentració de 2 µM de PE.

Per tal de conèixer la reactivitat vascular de les artèries, es van valorar les respostes vasodilatadores i contràctils dels anells aòrtics a diferents agents vasoactius, tal i com s'especifica a continuació.

### 7.2. Estudi de la resposta vasodilatadora

L'avaluació de la resposta vasodilatadora dels anells aòrtics es va realitzar mitjançant l'anàlisi de la relaxació induïda per l'Ach, la BK i el nitroprussiat sòdic (SNP, *sodium nitroprusside*). Les respostes a l'Ach i la BK aporten informació de la relaxació dependent de l'endoteli, mentre que les induïdes per SNP, un donador d'NO, de la independent.

Per l'estudi de les respostes vasodilatadores, és necessari contraure prèviament els anells aòrtics. Així, es va utilitzar una concentració de 2 µM de PE per l'estudi de la relaxació induïda per l'Ach i pel SNP, mentre que una concentració de 100 nM de U46619, un anàleg de la prostaglandina H<sub>2</sub>, per l'estudi de la BK. Ambdues concentracions produeixen un 80% de l'efecte màxim.

Una vegada els anells estaven contrets, es van realitzar corbes concentració-resposta a Ach (10<sup>-8</sup> – 10<sup>-5</sup> M), a BK (10<sup>-9</sup> – 10<sup>-5</sup> M) i a SNP (10<sup>-9</sup> – 10<sup>-5</sup> M). Les respostes es van calcular com el percentatge de relaxació de la màxima contracció obtinguda amb PE o U46619. La sensibilitat dels agonistes es va expressar mitjançant el valor de pD<sub>2</sub>, que equival al -log (EC<sub>50</sub>), sent EC<sub>50</sub> la concentració que l'agonista produeix la meitat de l'efecte màxim (E<sub>màx</sub>).

Tots els agents vasoactius (PE, Ach, BK, SNP i U46619) es van obtenir de la casa comercial Sigma-Aldrich.

### 7.3. Estudi de la resposta vasoconstrictora

La PE és un agent que indueix la vasoconstricció a través de l'activació de receptors adrenèrgics. Així, la resposta vasoconstrictora dels anells aòrtics es va valorar a través de corbes concentració-resposta generades a partir de concentracions creixents de PE ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M). La resposta vasoconstrictora es va calcular com el percentatge entre la contracció obtinguda i la contracció màxima obtinguda amb la dosi més alta de PE. De manera similar a la resposta vasodilatadora, la sensibilitat de la PE es va expressar mitjançant el valor de  $pD_2$ .

A continuació, per tal d'estudiar el paper de l'NO basal en la relaxació, es va realitzar una segona corba de PE en presència d'L-NAME (*N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester*) (200  $\mu$ M) i de indometacina (10  $\mu$ M, dissolt en dimetilsulfòxid), ambdós productes de Sigma-Aldrich. L-NAME és un inhibidor de la NOS, de manera que calculant la diferència entre l'àrea sota la corba (AUC, *area under the curve*) de la primera i la segona corba de PE es pot quantificar la relaxació produïda per l'alliberació d'NO. La presència de la indometacina, un inhibidor de l'enzim COX, permet descartar la relaxació produïda per qualsevol producte derivat de l'acció d'aquest enzim, com ara la PGI<sub>2</sub>.

Cal tenir present que després de cada corba concentració-resposta, es van netejar els anells aòrtics amb solució de Krebs per tal de que poguessin tornar a assolir el to basal. Així mateix, paral·lelament, utilitzant anells aòrtics dels mateixos animals, es va realitzar un estudi només amb la presència de vehicle, per tal de comprovar que no hi havia diferències en la contracció de la primera i la segona corba de PE.

## 8. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT HEPÀTICA DE LA $\beta$ -OXIDACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS

Per a la determinació de l'activitat de la  $\beta$ -oxidació hepàtica se seguí un mètode descrit per Lazarow [389] que permet mesurar l'activitat de la  $\beta$ -oxidació mitocondrial i peroxisòmica.

### 8.1. Obtenció del sobrenedant post-nuclear

La determinació es realitzà utilitzant el sobrenedant post-nuclear que conté tant mitocondris com peroxisomes.

Per a obtenir el sobrenedant post-nuclear es va prendre una mostra de fetge fresc, prèviament perfós, d'aproximadament 200 mg i es va introduir en un tub que contenia 1 mL de tampó d'homogeneïtzació (Taula IV-2). Seguidament, les mostres es van homogenitzar amb un homogenitzador per a teixits tous de tipus *Dounce* (BDC-6015, Caframo) i es van centrifugar a 700 xg durant 10 min a 4°C. El sobrenedant resultant es va emmagatzemar a -20°C fins al seu ús. La concentració proteica del sobrenedant post-nuclear es va determinar mitjançant el mètode de Bradford (descriu en l'apartat 11.1.3).

Reactiu	Concentració
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4 (Scharlab)	50 mM
NaCl (Sigma-Aldrich)	150 mM
DTT (Sigma-Aldrich)	1 mM
EDTA (Sigma-Aldrich)	30 mM
Sacarosa (Panreac)	0.25 M
Aigua bidestil·lada	q.s.

**Taula IV-2.** Reactius i concentracions per la preparació del tampó d'homogeneïtzació per a l'obtenció del sobrenedant post-nuclear.

## 8.2. Assaig de $\beta$ -oxidació

L'assaig de  $\beta$ -oxidació utilitzat es basa en la quantificació de la conversió de palmitoil-CoA marcat en <sup>14</sup>C (insoluble en àcid) en acetyl-CoA-<sup>14</sup>C (soluble en àcid).

Per a dur a terme l'assaig, es va partir d'una mostra de sobrenedant postnuclear de fetge equivalent a 30  $\mu$ g de proteïna, a la qual es van afegir tots els reactius necessaris per a la conversió del derivat palmitoil-CoA marcat en <sup>14</sup>C en acetyl-CoA-<sup>14</sup>C. La reacció va tenir lloc en un volum final de 500  $\mu$ L. A la Taula IV-3 s'indiquen els diferents reactius i les concentracions utilitzades.

Reactiu	Concentració
NAD (Sigma-Aldrich)	200 mM
FAD (Sigma-Aldrich)	10 mM
DTT (Sigma-Aldrich)	1 mM
BSA (Sigma-Aldrich)	75 $\mu$ g/ml
CoA (Sigma-Aldrich)	100 $\mu$ M
L-carnitina (Sigma-Aldrich)	1 mM
Palmitoil-CoA (Sigma-Aldrich)	10 $\mu$ M
Sacarosa (Panreac)	0.25 M
Tris-HCl 50 mM pH 8 (Applichem)	q.s.

**Taula IV-3.** Reactius i concentracions utilitzades per a l'assaig de  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos.

A continuació, es van afegir 0.3  $\mu$ L (15 nCi) de palmitoil-CoA-<sup>14</sup>C (PerkinElmer) en cada tub de reacció i, després d'agitar les mostres mitjançant un vòrtex, es van incubar en un bany d'aigua a 37°C, moment en el qual s'inicià la reacció. Després d'11 min, es van afegir 250  $\mu$ L d'àcid perclòric fred al 7% per aturar la reacció d'oxidació i es van deixar les mostres incubar durant 1 hora a 4°C. Posteriorment, es van centrifugar les mostres a 15,000 rpm durant 2 min a 4°C per tal de separar el palmitoil-CoA-<sup>14</sup>C que no havia reaccionat (insoluble) amb l'acetyl-CoA-<sup>14</sup>C, producte de la reacció (soluble).

Finalment, es van transferir 500 µL del sobrenedant a un vial de centelleig amb 7 mL de líquid de centelleig (Ultima Gold™ MV, PerkinElmer), per tal de dur a terme la lectura de la radioactivitat en un comptador de centelleig (Packard 2100 Tricarb). Els resultats obtinguts s'expressen en nmol de palmitoil-CoA-<sup>14</sup>C oxidat/min/mg proteïna.

Cal tenir present que, per tal de determinar la radioactivitat inespecífica de reacció, es va realitzar tot el procediment amb dos tubs que contenien tant la mostra com els reactius però, previ a la incubació a 37°C, la reacció s'aturà amb àcid perclòric.

## **9. VALORACIÓ HISTOLÒGICA DEL FETGE I EL TEIXIT ADIPÓS**

En l'estudi 2, tan el fetge com el teixit adipós es van valorar histològicament a través de diferents tincions. L'estudi de la necrosi, la fibrosi i l'esteatosi de les mostres de fetge es va realitzar mitjançant les tincions d'hematoxilina-eosina (H/E), tricròmic de Masson i *Oil-Red O* (ORO), respectivament; mentre que, en el teixit adipós, la tinció d'H/E s'utilitzà per valorar la hipertròfia dels adipòcits.

Les mostres destinades a les tincions d'H/E i del tricròmic de Masson van ser fixades amb una solució de formol (Scharlau) al 10% durant 24 h i posteriorment emmagatzemades en una solució d'etanol (Scharlau) al 30% fins l'elaboració de blocs de parafina. Pel que fa a les mostres destinades a la tinció ORO, es van col·locar sobre un recipient de vinil Tissue-Tek® Cryomold (Sakura), es van cobrir amb OCT™ (Tissue-Tek, Torrance, CA, USA) i immediatament es van congelar a -80°C.

La preparació dels talls histològics així com les tincions van ser realitzades a la Unitat d'anàlisi histològic i Banc de Tumors (BioBanc) de l'Hospital Clínic de Barcelona.

A continuació, s'especifiquen les característiques de cada tinció i com es va dur a terme la valoració de les mostres en cada cas.

### **9.1. Tinció d'hematoxilina-eosina (H/E)**

La tinció d'H/E es basa en una doble coloració de les estructures cel·lulars. Per una banda, l'hematoxilina tenyeix les estructures àcides (basòfiles), com ara els àcids nucleics, de color blau-púrpura, mentre que per l'altra, l'eosina tenyeix les estructures bàsiques (acidòfiles), com per exemple el citoplasma, d'un color rosat-vermellós [390].

#### **9.1.1. Tinció d'hematoxilina-eosina en mostres hepàtiques**

En el fetge, la tinció d'H/E es va utilitzar per la valoració de la necrosi. La interpretació es va realitzar en el Banc de Tumors (BioBanc) de l'Hospital Clínic de Barcelona per un investigador que no coneixia a quin grup pertanyia cada mostra mitjançant els paràmetres indicats a la Taula IV-4.

Grau de lesió	Descripció
0	Negativa
1	Escassa (< 1%)
2	Lleu (< 5%)
3	Moderada (< 10%)
4	Severa ( $\geq$ 10%)

**Taula IV-4.** Criteris utilitzats per la valoració de la necrosi en mostres hepàtiques.

### 9.1.2. Tinció d'hematoxilina-eosina en mostres de teixit adipós

En el teixit adipós, la tinció d'H/E va permetre quantificar el nombre i la mida dels adipòcits així com l'àrea d'infiltració de macròfags.

Mitjançant un microscopi (BX51, Olympus), es van captar imatges de les preparacions a x10 augments. A continuació, es va mesurar l'àrea de les cèl·lules de manera semi-automàtica en un mínim de 30 camps per mostra (n=5), seguint el protocol descrit per Parlee i col. [391]. La quantificació es va realitzar mitjançant el *software* Image J 1.49v (National Institutes of Health, USA). Cal destacar que, en el moment de valorar les mostres, l'investigador no coneixia a quin grup corresponia cada una.

## 9.2. Tinció tricròmica de Masson

La tinció tricròmica de Masson evidencia les fibres de col·lagen, motiu pel qual s'utilitzà per a la valoració de la fibrosi hepàtica. Es basa en l'ús de tres colorants per poder diferenciar el nucli cel·lular, el citoplasma i les fibres de col·lagen [392]. Hi ha diferents composicions de tints possibles. En aquest cas, es va utilitzar l'hematoxilina, que tenyeix els nuclis de color blau, la fucsina àcida, que tenyeix els eritròcits i el citoplasma de color fúcsia-violaci i el blau d'anilina que s'uneix a les fibres de col·lagen atorgant-hi un color blau més clar que l'hematoxilina.

La valoració de les mostres es va realitzar en el Banc de Tumors (BioBanc) de l'Hospital Clínic de Barcelona seguint els criteris establerts a la Taula IV-5.

Grau de lesió	Descripció
0	Negativa
1	Expansió fibrosa portal sense septes i/o en la vena cava i/o fibrosi sinusoïdal i/o intercel·lular
2	Entre un i algun septe
3	Nombrosos septes, sense cirrosi
4	Cirrosi

**Taula IV-5.** Criteris utilitzats per la valoració de la fibrosi en mostres hepàtiques.



### 9.3. Tinció amb *Oil Red O*

La tinció ORO es va utilitzar per determinar l'esteatosi de les mostres hepàtiques, ja que permet tenyir triglicèrids i lípids [393].

Per a la seva valoració, es van captar imatges a x10 augments a través d'un microscopi (BX51, Olympus) i, posteriorment, es va mesurar l'àrea tenyida per ORO de com a mínim 15 camps per mostra (n=5-6), mitjançant el *software* Image J 1.49v (National Institutes of Health, USA). El càlcul del percentatge de l'àrea tenyida en relació a l'àrea total de cada mostra va permetre quantificar l'esteatosi de les mostres i establir el grau de lesió segons la Taula IV-6.

Grau de lesió	Descripció
0	Negativa (< 5%)
1	Lleu (5-10%)
2	Moderada (10-30%)
3	Severa (> 30%)

**Taula IV-6.** Criteris utilitzats per la valoració de l'esteatosi en mostres hepàtiques.

## 10. ANÀLISI DE L'EXPRESIÓ GÈNICA

### 10.1. Obtenció d'RNA

Per a l'extracció d'RNA, les mostres es van homogenitzar amb 1 mL de TRIzol® (Life Technologies) i es van deixar incubar durant 5 min a temperatura ambient. A continuació, els homogenats es van transferir a un tub, en el qual es van afegir 200 µL de cloroform (Scharlab). S'agità vigorosament i es deixà incubar durant 3 min més. Seguidament, les mostres es van centrifugar a 12,000 xg durant 15 min a 4°C. La fase aquosa resultant (la fase superior) es va transferir en un nou tub i es van afegir 500 µL d'isopropanol (Scharlab) per tal de permetre la precipitació de l'RNA. Després d'incubar les mostres durant 10 min a temperatura ambient, se centrifugaren de nou a 12,000 xg durant 15 min a 4°C. A continuació, es va descartar el sobrenedant i es va netejar el *pellet* amb 1 mL d'etanol fred al 70% (v/v). Les mostres es van centrifugar a 7,500 xg durant 5 min a 4°C. De nou, es descartà el sobrenedant i es realitzà un segon rentat amb etanol. Després de la centrifugació, es descartà el sobrenedant i es deixà assecar el *pellet* per evaporació de l'etanol. Finalment, el *pellet* es va resuspendre amb 25-100 µL d'aigua DEPC i es va conservar a -80°C fins el seu ús. L'aigua DEPC és aigua bidestil·lada que conté un 0.1% de dietilpirocarbonat (DEPC, *diethyl pyrocarbonate*) (Sigma-Aldrich), el qual permet inactivar els enzims RNAses.

Les mostres de teixit hepàtic (60 mg) es van homogenitzar amb un homogenitzador de tipus *Dounce* (BDC-6015, Caframo), mentre que les de teixit muscular (150 mg), a causa de la seva consistència, a través d'un homogenitzador mecànic (Polytron® PT 1200E). En canvi, les mostres de teixit adipós, còrtex, hipocamp i hipotàlem es van micronitzar mitjançant un morter i una mà de morter amb nitrogen líquid. Per a aquests teixits s'utilitzà un volum aproximat de 200-500 µL de teixit micronitzat.

Per altra banda, en el cas del teixit adipós i el múscul, abans d'afegir el cloroform, es va realitzar una centrifuga prèvia de 12,000 xg durant 10 minuts a 4°C per tal d'eliminar el greix i el material no dissolt, respectivament.

Pel que fa a l'aorta, l'RNA es va extreure mitjançant el *RNeasy mini kit* (Qiagen), seguint les instruccions del fabricant.

##### **10.1.1. Quantificació i valoració de l'integritat de l'RNA**

La determinació de la concentració d'RNA es va realitzar mitjançant l'espectrofotòmetre Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) que, a través de la lectura de l'absorbància a 260 nm, proporciona la concentració de cada mostra.

Per altra banda, a partir de les lectures de l'absorbància a 230, 260 i 280 nm s'obtenen els valors dels quocients 260/280 i 260/230 que permeten determinar la integritat i la puresa de les mostres. Així, les mostres presenten una bona integritat i puresa quan el primer quocient és pròxim a 2 i el segon superior a 1.70.

A més, per tal de comprovar la integritat de l'RNA, les mostres obtingudes es van sotmetre a una electroforesi en un gel al 1% (p/v) d'agarosa (Bioron). El gel es va preparar amb tampó TBE 1X, al qual s'hi va afegir 0.02% (v/v) de bromur d'etidi (Gibco BRL). El tampó TBE 1X, que també s'utilitza com a tampó d'electroforesi, es prepara a partir d'una solució de TBE 5X, la qual conté 340 mM de Tris base (AppliChem), 440 mM d'àcid bòric (Panreac), 10 mM d'EDTA (Sigma-Aldrich) i q.s. d'aigua destil·lada.

En cada pou del gel, es va carregar el volum equivalent a 1 µg d'RNA de cada mostra, 1 µL de tampó de càrrega 6X i la q.s.p 6 µL d'aigua DEPC. El tampó de càrrega 6X conté 0.25% (p/v) de blau de bromofenol (Sigma-Aldrich), 0.25% (p/v) de xilenol (Sigma-Aldrich) i 40% (p/v) de sacarosa (Panreac) i q.s. d'aigua bidestil·lada autoclavada.

Després de sembrar el gel, es va dur a terme l'electroforesi a un voltatge constant de 100 V durant aproximadament 30 min. Passat aquest temps, el gel es va observar sota una làmpada de llum ultraviolada (MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems), gràcies al qual es pot comprovar la integritat de l'RNA a través de la presència de dues bandes corresponents a les subunitats 28s i 18s de l'RNA ribosòmic.

## 10.2. Reacció de retrotranscripció

La reacció de retrotranscripció, també anomenada reacció de la transcriptasa inversa, permet sintetitzar una cadena de DNA complementària (cDNA) a partir d'una molècula d'RNA missatger (mRNA). Aquesta reacció és catalitzada per l'enzim transcriptasa inversa, una DNA-polimerasa dependent d'RNA. Per tal que es pugui dur a terme, també són necessàries petites cadenes de nucleòtids, anomenades *Random Hexamers*, que faciliten l'inici de la síntesi de la nova cadena de cDNA, així com diferents nucleòtids (dNTPs) que permeten la seva elongació. A continuació, es detallen els diferents reactius necessaris per cada reacció de retrotranscripció (Taula IV-7). El volum final per a cada reacció va ser de 20 µL.

Reactiu	Concentració / Quantitat
Random Hexamers (Roche)	6.25 ng/µL
dNTPs (Sigma-Aldrich)	500 µM (cadascun)
Tampó 5X <i>First Strand</i> (Invitrogen)	1X (50 mM Tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl <sub>2</sub> )
DTT (Invitrogen)	10 mM
M-MVL-RT Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Invitrogen)	10 U/µL
RNasa Out (Invitrogen)	1 U/µL
RNA total	Volum equivalent a 1-3 µg
H <sub>2</sub> O DEPC	q.s.p.

**Taula IV-7.** Reactius i proporcions utilitzades per la realització de la reacció de retrotranscripció.

Els tubs que contenen la mescla d'aquests reactius es van disposar en un termociclador (MJ Mini™ Personal Thermal Cycler, Bio-Rad) i es van sotmetre al següent programa: 5 min a 65°C, 5 min a 4°C, 2 min a 37°C, 10 min a 25°C, 50 min a 37°C i 15 min a 70°C. La reacció de retrotranscripció té lloc durant l'etapa de 50 min a 37°C, mentre que les primeres etapes permeten principalment la desnaturalització de les possibles estructures secundàries de l'RNA i la darrera la inactivació de l'enzim. El cDNA resultant es va conservar a -20°C fins a la seva utilització.

## 10.3. Reacció en cadena de la polimerasa: qPCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) és una tècnica que permet l'amplificació d'un determinat fragment de DNA fins a nivells fàcilment detectables. Per dur-se a terme, es requereix l'enzim DNA polimerasa, que permet la síntesi de les noves molècules de DNA, així com dos oligonucleòtids específics, anomenats encebadors o *primers*, que són complementaris a seqüències presents a cada una de les cadenes de DNA i que delimiten el fragment de DNA a amplificar.

La PCR consta de diferents passos. En primer lloc, es duu a terme la fase de desnaturalització, que permet la separació de les dues cadenes de DNA, seguida de la fase d'hibridació dels *primers*, en la qual aquests s'alinearan i s'uniran a la seva seqüència complementària de DNA. Finalment, té lloc la fase d'elongació en la qual la DNA polimerasa sintetitza noves cadenes de DNA complementàries a la cadena de DNA motlle. Les cadenes resultants serveixen de motlle en els següents cicles de manera que, després de  $n$  cicles, s'obtenen  $2^n$  molècules de la seqüència amplificada.

En la present tesi, es va utilitzar la tècnica de PCR en temps real, també anomenada PCR quantitativa (qPCR), que és una variant de la PCR en la qual el procés d'amplificació i detecció es produeix simultàniament. En aquest cas, s'afegeix una substància marcada amb un fluorocrom que s'uneix a les cadenes de DNA generades. La lectura de la fluorescència permet la quantificació de l'expressió del gen d'interès, ja que la fluorescència alliberada en cada cicle és proporcional a la quantitat de DNA sintetitzat.

Per dur a terme la tècnica de PCR, es van utilitzar plaques de 96 pous (Applied Biosystem), en les quals cada pou contenia 10-50 ng de cDNA obtingut en la retrotranscripció, 10  $\mu$ L de *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem), 0.4  $\mu$ L de la mescla dels dos encebadors, sentit (*forward*) i antisentit (*reverse*), a una concentració de 200 nM en un volum final de reacció de 20  $\mu$ L.

La reacció va tenir lloc en el termociclador *StepOnePlus™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block* (Applied Biosystem) el qual realitza un pas inicial de desnaturalització a 95°C durant 10 min, seguit de 40 cicles d'amplificació. Cada un d'aquests cicles consisteix en 15 s a 95°C, seguit per 60 s a 60°C. Finalment, hi ha una fase, anomenada fase de fusió o *melting*, en la qual s'incrementa progressivament la temperatura de 60°C a 95°C. A mesura que la temperatura augmenta, el DNA de doble cadena es dissocia a DNA d'una cadena, alliberant el fluorocrom. D'aquesta manera, s'obté l'anomenada *melting curve* que permet comprovar l'especificitat de la reacció. Les reaccions de PCR es van dur a terme per duplicat i van ser normalitzades per gens controls (*Actb* i *Tbp*), utilitzant el mètode  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

Els parells de *primers* utilitzats per a cada gen, es van dissenyar amb el *software Primer Blast* (National Center for Biotechnology Information (NCBI)). Sempre que fos possible, es va seleccionar que els *primers* fossin multi-exonals, tinguessin un contingut de GC d'aproximadament el 50%, presentessin temperatures de *melting* compatibles i que l'amplificació tingués entre 70 i 150 bp. A la Taula IV-8 es detallen les seqüències dels *primers* utilitzats.

## Seqüències dels primers

<i>Gen</i>	Ref. NCBI	Forward	Reverse	Producte de PCR
<i>Ac6</i>	NM_001270785.1	5'-FCTTTGCCACCAGTTCTCTGC-3'	5'-GCCTTGGCTAATTAAGCGCC-3'	107 bp
<i>Ace</i>	NM_012544.1	5'-GAGCCATCCTTCCCTTTTC-3'	5'-GGCTGCAGCTCCTGGTATAG-3'	154 bp
<i>Aco</i>	NM_017340.2	5'-GTGAGGGCCAGTCTGAAA-3'	5'-ACTGCTGGGTTTAAAAATCCA-3'	70 bp
<i>Actb</i>	NM_031144.3	5'-CTAAGGCCAACCGTAAAAAG-3'	5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'	55 bp
<i>Adipoq</i>	NM_144744.3	5'-GAGACGCAGGTGTTCTTG-3'	5'-CCTACGCTGAATGCTGAG-3'	148 bp
<i>Adra1a</i>	NM_017191.2	5'-ACCTCCTCCTCACCTCCACT-3'	5'-GGGTGACAATGGTGGGATAG-3'	204 bp
<i>Adra1b</i>	NM_016991.2	5'-AGCGGTAGATGTCCTGTGCT-3'	5'-AGATGACCGTGGACAAGACC-3'	164 bp
<i>Adra1d</i>	NM_024483.1	5'-AGCCTCTGCACCATCTCTGT-3'	5'-AAGGAGCACACGGAAGAGAA-3'	233 bp
<i>Agrp</i>	NM_033650.1	5'-TTCCAGGAACCAAGGGAGG-3'	5'-TGCCCTGAGCTTATATGGCA-3'	94 bp
<i>Agtr1a</i>	NM_030985.4	5'-CACAGTGTGCGGTTTCATT-3'	5'-GTAAGGCCAGCCCTATGG-3'	63 bp
<i>Agtr2</i>	NM_012494.3	5'-TTGTGTTGGCATTTCATTG-3'	5'-ATACCCATCCAGGTCAGAGCAT-3'	76 bp
<i>ApoCIII</i>	NM_012501.2	5'-GCCTGCCAGTTTATCCCT-3'	5'-CACGATGAGGAGCATTGCGG-3'	81 bp
<i>Atf4</i>	NM_024403.2	5'-AATGGCTGGCTATGGATGGG-3'	5'-TCTGTCCCGAAAAGGCATC-3'	70 bp
<i>Atgl</i>	NM_001108509.2	5'-GCAATCTCTACCGCTCTCG-3'	5'-CGAAGTCCATCTCGGTAGCC-3'	91 bp
<i>Bdkrb1</i>	NM_030851.1	5'-GCAGCGCTTAACCATAGCGGAAAT-3'	5'-CCAGTTGAAACGGTTCCCGATGT-3'	112 bp
<i>Bdkrb2</i>	NM_173100.2	5'-TTTGTCTCAGCGTGTCTG-3'	5'-TCACAAGCATCAGGAAGCAG-3'	226 bp
<i>Cart</i>	NM_017110.1	5'-GGACATCTACTCTGCCGTGG-3'	5'-CAATCTGCAACACAGCGCC-3'	89 bp
<i>Cat</i>	NM_012520.2	5'-CGCCTGTGTGAGAACATTGC-3'	5'-TAGTCAGGGTGGACGTCAGT-3'	95 bp
<i>Cd36</i>	NM_031561.2	5'-CGTATGGTGTGCTGGACATTG-3'	5'-CTTGCATGTAGAAATGTGGAAGA-3'	79 bp
<i>Chop</i>	NM_001109986.1	5'-TGACCCTGCATCCCTAGCTT-3'	5'-GCTTTGGGAGGTGCTTGTGA-3'	70 pb
<i>Colla1</i>	NM_001134530.1	5'-TTTGTGCTAAACCAGGAGGATATTA-3'	5'-TGGCTGGATGGGATTTGG-3'	72 bp
<i>Cox1</i>	NM_017043.4	5'-AAGTACTCATGCGCTGGTACTC-3'	5'-CATGTGCTGTGTTGTAGGTTGGA-3'	75 bp
<i>Cox2</i>	NM_017232.3	5'-TCGACTTTCCAGGATGGAAA-3'	5'-GAGTGTCTTTGACTGTGGGAGGAT-3'	77 bp
<i>Cpt-1a</i>	NM_031559.2	5'-TGCAGAACACGCAAAATGA-3'	5'-CCGACCTGAGAGGACCTTGA-3'	70 bp
<i>Dnajb9</i>	NM_012699.2	5'-GGTTTGGAGAAGCTGCGTGC-3'	5'-TGCAGATGGCAAAGACGAAAA-3'	80 bp
<i>Edem1</i>	NM_001305279	5'-TTGCCAGACGAGCTGTGAAA-3'	5'-TTTCCAACCAATGGCTGT-3'	100 bp
<i>Fabp4</i>	NM_053365.1	5'-TGAAAGTCGACCACCATAAGA-3'	5'-GTCACGCCTTTCATGACACATT-3'	75 bp
<i>Fas</i>	NM_017332	5'-GGCTCTATGGTTGCCTAAGC-3'	5'-GGTGGACCCAAAAAAGGA-3'	78 bp
<i>F4/80</i>	NM_001007557.1	5'-CAGATGGGGATGACCACAC-3'	5'-AACTCTCCGTGGTGCAGTG-3'	116 bp
<i>G6p</i>	NM_013098.2	5'-GGCTCACTTCCCATCAGG-3'	5'-ATCCAAGTGCAGAAACCAACAG-3'	146 pb
<i>Gadd34</i>	NM_001304816	5'-CTGGTCCAGGCAGACCATC-3'	5'-CTGTTTTGCTCACACCAAGG-3'	83 bp
<i>Gap43</i>	NM_017195.3	5'-CAACGGAGACTGCAGAAAGC-3'	5'-GTCGGGCACTTTCCTTAGGT-3'	81 bp
<i>Gcsa1</i>	NM_017090.2	5'-CAGTGTGGAGAGCTGGATGTCT-3'	5'-AATCCCCCTGCCACACAAT-3'	68 bp
<i>Gpx1</i>	NM_030826.4	5'-TCGGTTTCCCGTGAATC-3'	5'-TGAGGGAATTCAGAATCTCTTATT-3'	69 bp
<i>Grp78</i>	NM_013083.2	5'-AAGGAGGATGTAGGCACGGT-3'	5'-GCGCCGTTCTTGAATACAC-3'	78 bp
<i>Grp94</i>	NM_001012197.2	5'-ACCTTCGGGTTTGTGAGAGC-3'	5'-GTCTGTCCGTGAGCCTTCTC-3'	93 bp
<i>Hsl</i>	NM_012859.1	5'-TGGATTTACGCACAATGACACA-3'	5'-GCTTGAGAAGAAGGCCATGTTG-3'	68 bp
<i>Ide</i>	NM_013159.1	5'-CGTGAAGCGACTGTGTGGAT-3'	5'-TCTATTCTCTGGATGGCCGGA-3'	72 bp
<i>Il-6</i>	NM_012589.2	5'-ATATGTTCTCAGGGAGATCTGGAA-3'	5'-TGCATCATCGCTGTTTACATA-3'	79 bp
<i>Irs-1</i>	NM_012969.1	5'-GCCCTCAGAATGCTACTATGG-3'	5'-TAAAGGACCTTGGTAATGAGTAGTAGGA-3'	81 bp
<i>Irs-2</i>	NM_001168633.1	5'-GTGTATACCGCTATGCCTGTCT-3'	5'-GGCTGTTCCGAATTGAGCTT-3'	64 bp
<i>Lep</i>	NM_013076.3	5'-GGTACCAGGTTTGGACTTCA-3'	5'-GGTCTGGTCCATCTGGACAA-3'	67 bp
<i>Lepr</i>	NM_012596	5'-GCTGGTCAGCAACGTGAAAA-3'	5'-GGAATGTTTCTGGCGATGC-3'	91 bp
<i>Lpk</i>	NM_012624.3	5'-GAACATTGCAGACTCAACTTCTC-3'	5'-CGGATGTTGGCGATGGAT-3'	69 bp
<i>Lpl</i>	NM_012598.2	5'-CTCCAGAGTTTGACCGCCTT-3'	5'-TTCAGGGGCTTATGGGCAA-3'	99 bp
<i>Lrp</i>	NM_001130490.1	5'-GCGGTGTGACAACGACAA-3'	5'-TCTGCCACTGTTGCACTTGA-3'	97 bp
<i>Mcp1</i>	NM_031530.1	5'-CTGTCTCAGCCAGATGCAGTTAA-3'	5'TGGGATCATCTTGCCAGTGA-3'	69 bp

## IV. MATERIALS I MÈTODES

<i>Mmp9</i>	NM_031055.1	5'-GACCTCAAGTGGCACCATCA-3'	5'-AGTCATCGATCAGTCTCGC-3'	82 bp
<i>Nox1</i>	NM_053683.1	5'-ATACACATCACCTTTTCATCATCTATATCA-3'	5'-GTTTGACCCCGACAATCC-3'	76 bp
<i>Nox4</i>	NM_053524.1	5'-CGCACAGTCCTGGCTTACCT-3'	5'-GCTTTTGTCCAACAATCTTCTTGT-3'	75 bp
<i>Npy</i>	NM_012614.2	5'-CGCTCTGCGACACTACATCA-3'	5'-TGGGGGCATTTTCTGTGCTT-3'	113 bp
<i>Pcsk9</i>	NM_199253.2	5'-ACATGTCACAGAGTGGGACG-3'	5'-TCCCGGTTCCAGCATCATAGC-3'	73 bp
<i>Pepck</i>	NM_198780.3	5'-ACGGTGGGAACTCACTGCTT-3'	5'-TGCCTTCGGGGTTAGTTATGC-3'	123 pb
<i>Pde4d</i>	NM_001113328.1	5'-GCCAGCCTTCGAACTGTAAG-3'	5'-ATGGATGGTTGGTTGCACAT-3'	98 bp
<i>Pde5a</i>	NM_133584.1	5'-CCCTTTGGAGACAAAACGAGAG-3'	5'-AGGACTTTGAGGCAGAGAGC-3'	129 bp
<i>Pomc</i>	NM_139326	5'-GTGTTTCCAGGCAACGGAGA-3'	5'-CAGCGGAAGTGACCATGAC-3'	84 bp
<i>Pten</i>	NM_031606.1	5'-AGAGACATTATGACACCGCCA-3'	5'-AGCTGTGGTGGTTATGGTC-3'	76 bp
<i>Ptgis</i>	NM_031557.2	5'-GCAGGAGAAAGTCTGCTTGA-3'	5'-TCCACTCCATACAGGGTCAGGTA-3'	75 bp
<i>Ppara</i>	NM_013196.1	5'-TGGAGTCCACGCATGTGAAG-3'	5'-CGCCAGCTTTAGCCGAATAG-3'	64 bp
<i>Ptp1b</i>	NM_012637.2	5'-AGTACGGCAGTTGGAGTTGG-3'	5'-CAGGGACTCCAAAGTCAGGC-3'	95 bp
<i>Scd1</i>	NM_139192.2	5'-CAGAGCCAGGTGCCACTTTT-3'	5'-TGCTAGAGGGTGTACCAAGCTTT-3'	104 bp
<i>Socs3</i>	NM_053565.1	5'-GCTTTTCGCTGCAGAGTGAC-3'	5'-GGTCCGTCGGTGTAAAGA-3'	127 bp
<i>Sod2</i>	NM_017051.2	5'-CGTCACCAGGAGAAGTACCA-3'	5'-AGGCTGAAGAGCAACCTGAGTT-3'	70 bp
<i>Syn1</i>	NM_019133.2	5'-GTGCCACCACCCATCATTGC-3'	5'-GGCTGGCTCTGGAAGTTGA-3'	99 bp
<i>Tbp</i>	NM_001004198.1	5'-TGGGATTGTACCACAGCTCCA-3'	5'-CTCATGATGACTGCAGCAAACC-3'	132 bp
<i>Tbxas</i>	NM_012687.1	5'-GAGCTCCGAGAGCGATATGG-3'	5'-CTGGGTCTGAAATGACAATGTACAT-3'	76 bp
<i>Tgfb1</i>	NM_021578.2	5'-CCCCTACATTTGGAGCCTGG-3'	5'-TTGCGACCCACGTAGTAGAC-3'	141 bp
<i>Timp1</i>	NM_031055.1	5'-CCTAGAGACACGCTAGAGCAG-3'	5'-AGCAACAAGAGGATGCCAGA-3'	73 bp
<i>Tlr4</i>	NM_019178.1	5'-TTGTTCTTCTGCCTGAGA-3'	5'-TGATCCATGCATTGGTAGGTAATATT-3'	83 pb
<i>Tnfa</i>	NM_012675.3	5'-ATCCGAGATGTGGAAGTGGC-3'	5'-CGATCACCCGAAGTTCAGTA-3'	151 pb
<i>Xbp1</i>	NM_001004210.2	5'-TCCGAGCACTCAGACTACGT-3'	5'-ATGCCCAAAGGATATCAGACTC-3'	130 bp
<i>Xbp1s</i>	NM_001004210.2	5'-GAGTCCGAGCAGGTG-3'	5'-CGTCAGAATCCATGGGAA-3'	288 bp
<i>Vldlr</i>	NM_013155.2	5'-CCAGGAACAGGACTGCAGAG-3'	5'-GCCACCGTTATTGACCAAGC-3'	82 bp

**Taula IV-8.** Seqüències dels *Primers* utilitzats en la reacció de PCR i mida de l'amplicó resultant.

## 11. IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES TISSULARS

### 11.1. Obtenció d'extractes

#### 11.1.1. Obtenció d'extractes de proteïna total

Per a l'extracció de proteïna total, les mostres es van homogenitzar amb tampó de lisi i es van incubar en agitació constant a 4°C durant 1.5 h. A continuació, es realitzà una centrifuga de 15,000 xg durant 15 min a 4°C i s'obtingué el sobrenedant, al qual es conservà en alíquotes a -80°C fins el seu ús.

De la mateixa manera que en l'extracció d'RNA, el fetge (100 mg) i el múscul (150 mg) es van homogenitzar amb un homogenitzador de tipus *Dounce* (BDC-6015, Caframo) i un homogenitzador mecànic (Polytron® PT 1200E), respectivament. Pel que fa a les mostres de teixit adipós, aorta, còrtex i hipocamp, s'utilitzà un volum aproximat de 200-500 µL de teixit micronitzat i s'homogeneitzà mitjançant un morter i una mà de morter amb nitrogen líquid.

Pel que fa al tampó de lisi, aquest conté detergents que permeten solubilitzar les proteïnes i inhibidors de proteases, fosfatases i acetilases. A la Taula IV-9 es descriu el tampó utilitzat per les mostres de fetge (1 mL), múscul (1 mL) i teixit adipós (750 µL). Pel que fa a les mostres d'aorta (300 µL), còrtex (500 µL), i hipocamp (500 µL) es va utilitzar el mateix tampó però substituint el Tris-HCl, NaCl i Igepal® pel tampó comercialitzat RIPA (Sigma-Aldrich) que conté 50 mM de Tris-HCl pH=8, 150 mM de NaCl, 1% d'Igepal®, 0.5% de deoxicolat sòdic i 0.1% de dodecilsulfat sòdic (SDS, *sodium dodecyl sulfate*).

Reactiu	Concentració
Tris-HCl pH = 8 (AppliChem)	50 mM
NaCl (Sigma-Aldrich)	150 mM
Igepal® (Sigma-Aldrich)	1%
NaF (Sigma-Aldrich)	10 mM
EDTA (Sigma-Aldrich)	1 mM
EGTA (Sigma-Aldrich)	1 mM
Nappi (Sigma-Aldrich)	2 mM
PMSF (Sigma-Aldrich)	1 mM
Aprotinina (Sigma-Aldrich)	2 µg/mL
Leupeptina (Sigma-Aldrich)	2 µg/mL
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Sigma-Aldrich)	1 mM
NaM (Sigma-Aldrich)	10 mM
TSA (Sigma-Aldrich)	1 µM
Aigua bidestil·lada	q.s.

**Taula IV-9.** Reactius i concentracions utilitzades pel tampó de lisi.

### 11.1.2. Obtenció d'extractes de proteïnes nuclears

L'extracció de proteïnes nuclears es realitzà amb mostres de fetge i de teixit adipós. Mostres d'aproximadament 150 mg de fetge i d'un volum de teixit adipós micronitzat d'aproximadament 1 mL es van homogenitzar amb 600 µL de tampó d'homogeneïtzació (Taula IV-10), mitjançant un homogenitzador de tipus *Dounce* (BDC-6015, Caframo) o bé per micronització.

Després de deixar les mostres incubar durant 10 min a 4°C, es va realitzar una centrifuga de 2,000 xg durant 10 min a 4°C, amb l'objectiu de precipitar els nuclis. A continuació, es va descartar el sobrenedant i el *pellet* obtingut es va resuspendre de nou amb 600 µL de tampó d'homogeneïtzació seguit d'una segona centrifuga de 2,000 xg durant 10 min a 4°C. El *pellet* resultant es va resuspendre amb 300 µL (en el cas del fetge) o 125 µL (en el cas del teixit adipós) de tampó de lisi (Taula IV-9). Les mostres es van deixar incubar durant 1.5 h a 4°C en agitació constant i se centrifugaran a 25,000 xg durant 30 min a 4°C. El sobrenedant obtingut s'aliquotà i s'emmagatzemà a -80°C fins a la seva utilització.

Reactiu	Concentració
Tris-HCl pH = 8 (AppliChem)	10 mM
MgCl <sub>2</sub> (Panreac)	1,5 mM
NaF (Sigma-Aldrich)	10 mM
KCl (Fischer Scientific)	10 mM
DTT (Invitrogen)	0.5 mM
Nappi (Sigma-Aldrich)	2 mM
PMSF (Sigma-Aldrich)	1 mM
Aprotinina (Sigma-Aldrich)	2 µg/mL
Leupeptina (Sigma-Aldrich)	2 µg/mL
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Sigma-Aldrich)	1 mM
NaM (Sigma-Aldrich)	10 mM
TSA (Sigma-Aldrich)	1 µM
H <sub>2</sub> O bidestil·lada	q.s.

**Taula IV-10.** Reactius i concentracions utilitzades pel tampó d'homogeneïtzació.

### 11.1.3. Determinació de la concentració de proteïna: mètode de Bradford

Per a la determinació de la concentració de proteïnes de les mostres extretes es va utilitzar el mètode descrit per Bradford [394], adaptat a la lectura en microplaca. Es basa en el fet que l'absorbància màxima de la solució àcida *Coomassie Blue G-250* canvia de 465 a 595 nm quan s'uneix a proteïnes, moment en què la coloració vira de marronosa a blavosa. Així, la lectura de l'absorbància a 595 nm és directament proporcional a la concentració proteica, que es determina per la interpolació a una recta de calibratge.

La tècnica es va dur a terme en microplaques de 96 pous, en els quals es van disposar 10 µL de la solució patró o de la mostra a analitzar. La recta de calibratge es va elaborar amb concentracions conegudes (de 0.1 a 0.6 µg/µL) d'una solució patró d'albumina bovina sèrica (BSA, Sigma-Aldrich). A continuació, s'afegiren 190 µL de reactiu de Bradford (Bio-Rad), prèvia dilució 1/5 amb aigua bidestil·lada. Després de deixar reaccionar els reactius durant uns minuts es prosseguí a la lectura de l'absorbància a 595 nm mitjançant un espectrofotòmetre de placa (Bio-Rad Benchmark Plus).

### 11.2. Assaig de Western Blot

La tècnica de *Western Blot* permet determinar els nivells de proteïnes específiques de diverses mostres. Consta de diferents fases: l'electroforesi, que permet la separació de les proteïnes en un gel d'acrilamida en funció del seu pes molecular; la transferència, on es transfereixen les proteïnes del gel a una membrana; i la immunodetecció, que permet la identificació de les proteïnes mitjançant anticossos específics. A continuació, es detalla el procediment seguit.



### 11.2.1. Preparació de les mostres

Per a la preparació de les mostres, es van prendre volums de proteïna total o d'extracte nuclear equivalent a 10-50 µg de proteïna i s'hi van afegir la meitat del volum final de tampó de càrrega 2X i q.s. de Tris-HCl 20 mM pH 7.5. El tampó de càrrega 2X, descrit per Laemmli [395], conté 125 mM de Tris-HCl pH 6.8, 4% (p/v) de SDS, 20% (v/v) de glicerol, 10% (v/v) de β-mercaptoetanol, 0.012% (p/v) de blau de bromofenol i q.s. d'aigua bidestil·lada.

A continuació, les mostres es van bullir a 100°C durant 5 min en un bany sec (Techne Dri-block DB-2A) amb l'objectiu de desnaturalitzar les proteïnes.

### 11.2.2. Electroforesi

L'electroforesi es va dur a terme en gels de poliacrilamida anomenats SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Aquests es formen gràcies a la polimerització de l'acrilamida i la bisacrilamida, que s'inicia quan s'addiciona persulfat amoni (APS, *ammonium persulfate*) i tetrametiletildiamina (TEMED, *tetramethylethylenediamine*). Els gels consten de dues fases: la fase concentradora, amb un baix percentatge d'acrilamida-bisacrilamida, que permet la concentració de les proteïnes sembrades; i la fase separadora, d'un percentatge d'acrilamida-bisacrilamida més alt, en el qual se separen les proteïnes. El percentatge del gel dependrà del pes molecular de les proteïnes a analitzar i determinarà la seva velocitat de migració i el seu grau de separació. Generalment, els més utilitzats són els 3-5% en els gels concentradors i entre el 8-12% en els gels separadors. A la Taula IV-11, s'especifiquen els reactius necessaris per a l'elaboració de dos gels SDS-PAGE, en aquest cas del 4% i el 8%.

Reactiu	Gel concentrador (4%)	Gel separador (8%)
	Volum	Volum
Acilamida-bisacrilamida 40% (AppliChem)	750 µl	4.50 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 (AppliChem)	---	5.63 ml
Tris-HCl 1M, pH 6.8 (AppliChem)	938 µl	---
SDS 10% (Sigma-Aldrich)	75 µl	255 µl
APS 10% (Sigma-Aldrich)	45 µl	300 µl
TEMED (Sigma-Aldrich)	12 µl	30 µl
Aigua bidestil·lada	q.s.p. 7.5 ml	q.s.p. 22.5 ml

**Taula IV-11.** Reactius i proporcions requerides per l'elaboració de dos gels SDS-PAGE.

Una vegada preparats els gels, es van col·locar en el sistema *MiniProtean III*<sup>®</sup> (Bio-Rad) i es va afegir tampó de migració, ajustat a pH=8, el qual conté 25 mM de Tris base (Applichem), 192 mM de glicina (AppliChem), 0.1% de SDS (Sigma-Aldrich) i q.s. d'aigua bidestil·lada. A continuació, es van carregar les mostres, juntament amb un marcador de pes molecular (*BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen) o bé *Precision Plus Protein™ Dual*

*Color Standards* (Bio-Rad), que permet identificar a quina alçada del gel es troba la proteïna d'interès. L'electroforesi es va dur a terme a un voltatge constant de 100 V i a temperatura ambient.

### 11.2.3. Transferència

Després de realitzar l'electroforesi, les proteïnes es van transferir del gel a una membrana de fluorur de polivinidè (PVDF) (Millipore) utilitzant el sistema *Mini Trans-Blot*<sup>®</sup> (Bio-Rad) que contenia tampó de transferència. Aquest tampó conté 25 mM de Tris base (AppliChem), 192 mM de glicina (AppliChem), 20% (v/v) de metanol (Fischer-Chemical) i q.s. d'aigua bidestil·lada. La transferència es va realitzar a 4°C a una intensitat constant de 200 mA durant 100-120 min.

### 11.2.4. Immunodetecció

La immunodetecció consisteix en la detecció del senyal quimioluminescent que produeix un anticòs secundari, unit a un anticòs primari específic per la proteïna d'interès.

Per tal de dur a terme la immunodetecció, les membranes obtingudes en la transferència es van rentar amb una solució anomenada TBS-T que conté TBS (*Tris-buffered saline*) (20 mM de Tris base, 150 mM de NaCl i q.s. d'aigua bidestil·lada) amb un 0.1% (v/v) del detergent Tween<sup>®</sup>20 (Sigma-Aldrich). A continuació, les membranes es van incubar amb una solució de bloqueig que contenia 5% de llet en TBS-T durant 1 h a temperatura ambient. Posteriorment, les membranes es van incubar durant tota la nit a 4°C amb una solució que contenia l'anticòs primari específic per la proteïna problema diluït en TBS-T amb 5% de BSA (Sigma-Aldrich). Passat aquest temps, es va procedir a la incubació durant 1 h a temperatura ambient de les membranes amb una solució que contenia l'anticòs secundari conjugat a un enzim peroxidasa diluït en TBS-T. A la Taula IV-12, s'especifiquen les referències per a cada anticòs.

Anticòs	Referència	Font
$\beta$ -actin	Sigma-Aldrich (A5441)	Mouse
$\beta$ -tubulin	Sigma-Aldrich (T4026)	Mouse
ACC	Cell Signaling (#3662)	Rabbit
Phospho-ACC (Ser <sup>79</sup> )	Cell Signaling (#3661)	Rabbit
Akt	Cell Signaling (#9272)	Rabbit
Phospho-Akt (Ser <sup>473</sup> )	Cell Signaling (#9271)	Rabbit
AMPK $\alpha$	Cell Signaling (#2532)	Rabbit
Phospho-AMPK $\alpha$ (Thr <sup>172</sup> )	Cell Signaling (#2535)	Rabbit
ATF6 $\alpha$	Santa Cruz (sc-22799)	Rabbit
ATGL	Santa Cruz (sc-365278)	Mouse
BACE	Cell Signaling (#5606)	Rabbit
ChREBP	Santa Cruz (sc-21189)	Goat
CPT-1A	*1	Rabbit
Phospho-CREB (Ser <sup>133</sup> )	Cell Signaling (#9198)	Rabbit
DRP1	Abcam (ab56788)	Mouse
eNOS	Cell Signaling (#9572)	Rabbit
Phospho-eNOS (Ser <sup>1177</sup> )	Cell Signaling (#9570)	Rabbit
FAS	Santa Cruz (sc-55580)	Mouse
FK	Santa Cruz (sc-50029)	Goat
FoxO1	Santa Cruz (sc-11350)	Rabbit
Phospho-FoxO1 (Ser <sup>256</sup> )	Santa Cruz (sc-101681)	Rabbit
G6P	Santa Cruz (sc-33839)	Goat
GCK	Santa Cruz (sc-7908)	Rabbit
GSK3 $\beta$	Cell Signaling (#9315)	Rabbit
Phospho-GSK3 $\beta$ (Ser <sup>9</sup> )	Cell Signaling (#9336)	Rabbit
HNF4	Santa Cruz (sc-6556)	Rabbit
HSL	Cell Signaling (#4107)	Rabbit
Phospho-HSL (Ser <sup>660</sup> )	Cell Signaling (#4126)	Rabbit
IDE	Abcam (ab32216)	Rabbit
iNOS	Cell Signaling (#13120)	Rabbit
IRE1	Abcam (ab37037)	Rabbit
Phospho-IRE1 (Ser <sup>724</sup> )	Abcam (ab104157)	Rabbit
IRS-1	Cell Signaling (#2382)	Rabbit
IRS-2	Santa Cruz (sc-1555)	Rabbit
JNK	Cell Signaling (#9252)	Rabbit
Phospho-JNK (Thr <sup>183</sup> /Tyr <sup>185</sup> )	Cell Signaling (#9251)	Mouse
LPL	Abcam (Ab93898)	Mouse
MFN2	Abcam (Ab56889)	Mouse
mTOR	Cell Signaling (#2972)	Rabbit
Phospho-mTOR (Ser <sup>2481</sup> )	Millipore (#09-343)	Rabbit
MTP	Santa Cruz (sc-135994)	Mouse
NAMPT	Abcam (ab37299)	Rabbit

<sup>1</sup> Anticòs cedit per les Dres. Laura Herrero i Dolors Serra (Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona).

OPA1	Bioscience (612606)	Mouse
PDE4	Abcam (ab14628)	Rabbit
PEPCK	Santa Cruz (sc-74823)	Rabbit
PERK	Santa Cruz (sc-13073)	Rabbit
Phospho-PERK (Thr <sup>981</sup> )	Santa Cruz (sc-32577)	Rabbit
PGC1 $\alpha$	Cayman (101707)	Rabbit
Phospho-PKA-C $\alpha$ (Thr <sup>197</sup> )	Cell Signaling (#4781)	Rabbit
PKG	Cell Signaling (#3248)	Rabbit
PPAR $\alpha$	Abcam (ab8934)	Mouse
PSD95	Abcam (ab18258)	Rabbit
SCD1	Abcam (ab19862)	Mouse
SIRT1	Santa Cruz (sc-15404)	Rabbit
SREBP-1	Santa Cruz (sc-366)	Rabbit
SYP	DAKO (M7315)	Mouse
Tau	Chemicon International (MAB361)	Mouse
Phospho-Tau (Ser <sup>404</sup> )	44-758G (Invitrogen)	Mouse
VASP	Cell Signaling (#3132)	Rabbit
Phospho-VASP (Ser <sup>157</sup> )	Cell Signaling (#3111)	Rabbit
Phospho-VASP (Ser <sup>239</sup> )	Cell Signaling (#3114)	Rabbit
VLDLR	Santa Cruz (sc-18824)	Mouse

**Taula IV-12.** Anticossos primaris utilitzats en la immunodetecció de proteïnes per Western Blot.

Finalment, es va detectar la proteïna d'interès mitjançant una reacció de quimioluminiscència generada entre l'enzim peroxidasa de l'anticòs secundari i el reactiu de detecció (*Immobilon Western HRP substrate Peroxide Solution*<sup>®</sup> (Millipore) o bé *ECL* (GE Healthcare)). El revelat de la senyal quimioluminiscent es va dur a terme mitjançant l'aparell Chemidoc<sup>™</sup> XRS (Bio-Rad) i es va quantificar mitjançant el *software* (ImageLab, Bio-Rad).

Entre els diferents passos (bloqueig, incubació amb anticòs primari, incubació amb anticòs secundari, addició del reactiu de detecció) es van realitzar 3 rentats de la membrana amb solució TBS-T de 5 minuts cadascun.

Per a normalitzar els resultats, es van utilitzar les proteïnes  $\beta$ -actina i  $\beta$ -tubulina, revelades a la mateixa membrana que la proteïna d'interès (Taula IV-13).

Anticòs	Referència
Anti-Goat IgG HRP	Santa Cruz (sc-2020)
Anti-Mouse IgG HRP	Amersham (NA931)
Anti-Rabbit IgG HRP	Amersham (NA934)

**Taula IV-13.** Anticossos secundaris utilitzats en la immunodetecció de proteïnes per Western Blot.

### 11.3. Immunoassaig enzimàtic: ELISA

La tècnica ELISA, descrita en l'apartat 5.2, també es va utilitzar per a determinar la quantitat d'una proteïna, concretament BDNF, en mostres de teixit de còrtex i d'hipocamp.

Es va dur a terme mitjançant el kit BDNF CYT306 (Millipore), el qual es basa en la realització d'un ELISA de tipus *sandwich*. Es van seguir les instruccions indicades en el kit, utilitzant una dilució 1:5 dels homogenats obtinguts en l'extracció de proteïna total (apartat 10.1).

### 11.4. Immunohistoquímica

La immunohistoquímica (IHC, *immunohistochemistry*) és una tècnica que permet mostrar la presència i la localització de determinades proteïnes en seccions tissulars. Per dur-la a terme, cal preservar les propietats de la mostra mitjançant un procés de fixació, i a continuació realitzar una immunodetecció de la proteïna d'interès.

#### 11.4.1. Preparació de les mostres

Per a la realització de l'IHC, es van utilitzar els cervells fixats amb una solució de paraformaldehid mitjançant una perfusió cardíaca (apartat 1.2).

Es van realitzar seccions coronals de 25 µm de grossor a una temperatura de -23°C mitjançant un criòstat (Leica Microsystems) i l'ús de la solució OCT™ (Tissue-Tek®). Les seccions es van guardar a -20°C fins la seva utilització en una solució crioprotectora que conté 30% glicerol (Sigma-Aldrich) i 30% etilenoglicol (Scharlau) en PB 0.1 M.

#### 11.4.2. Immunodetecció per fluorescència

En la present tesi es realitzà una immunodetecció per fluorescència mitjançant el mètode anomenat *free-floating*, el qual permet una bona penetració dels anticossos en el teixit.

En primer lloc, les seccions es van dipositar sobre una placa de petri que contenia PBS (*Phosphate buffered saline*) 0.1 M ( $K_2HPO_4$  14 g/L,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  2.65 g/L, NaCl 9 g/L) per tal d'eliminar la solució crioprotectora, així com seleccionar les seccions d'interès.

A continuació, les seccions es van incubar durant 2 h a temperatura ambient amb una solució de bloqueig que contenia 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*), 1% de tritó i 0.2% de gelatina en PBS 0.1 M. Seguidament, es van incubar durant tota la nit a 4°C amb una solució que contenia l'anticòs primari diluït en solució de bloqueig. El següent pas va ser la incubació amb una solució que contenia l'anticòs secundari (conjugat amb un fluorocrom) diluït en solució de bloqueig, durant 2 h a temperatura ambient i protegit de la llum. A la Taula IV-14, es detallen els anticossos utilitzats.

	Anticòs	Referència	Origen	Dilució
Anticòs primari	GFAP	DAKO (Z0334)	Rabbit	1:1000
Anticòs secundari	Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 594	Life technologies (A11012)	Goat	1:200

**Taula IV-14.** Anticossos utilitzats per la immunodetecció per fluorescència per Immunohistoquímica.

Posteriorment, es va procedir a la incubació de les seccions amb una solució que contenia 2 µg/mL de *Hoescht* H33342 (Sigma-Aldrich) en PBS 1M durant 8 min a temperatura ambient. El *Hoescht* és una tinció que permet detectar el DNA de mostres tissulars, mitjançant l'emissió de fluorescència a 455 nm (blava). Així, la seva aplicació permet realitzar una contratinció per tal d'identificar cada regió del cervell.

Entre els passos de bloqueig, incubació amb anticòs primari, incubació amb anticòs secundari i addició del reactiu *Hoescht* es van realitzar 5 rentats de 5 min cadascun amb PBS 0.1 M que contenia 0.5% de tritó (Sigma-Aldrich) (PBS-Tritó). A més, tant les incubacions com els rentats es van realitzar sempre en agitació.

Finalment, es va procedir a la preparació de les seccions en els portaobjectes (Superfrost® plus, Thermo-Fisher), mitjançant l'aplicació de *Fluoromount G™* (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA). Es van deixar assecar durant tota la nit i es conservaren a 4°C fins la seva utilització.

La quantificació de les mostres es va realitzar a partir d'imatges captades amb el microscopi de fluorescència (Olympus BX61) a x10 augments. Mitjançant el *software* Image J 1.49v (National Institutes of Health, USA) es va mesurar, per a cada zona, un mínim de 4 imatges de 4 animals diferents de cada grup. La determinació s'expressa com el percentatge de l'àrea tenyida en relació a l'àrea total de cada mostra.

## 12. ANÀLISI ESTADÍSTICA DELS RESULTATS

Els resultats obtinguts s'expressen com la mitjana ± l'error estàndard de la mitjana (SEM, *Standard error of the mean*) en l'estudi 1, i com la mitjana ± la desviació estàndard (SD, *Standard Deviation*) en l'estudi 2 del nombre (*n*) de mostres analitzades, indicat en cada peu de figura.

En general, l'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un test ANOVA d'una via seguit d'un post-test de Bonferroni. En el cas de l'estudi de la reactivitat vascular (corbes de concentració resposta), en el test GTT (concentracions de glucosa i insulina a diferents temps) així com en el test MWM (corba d'aprenentatge), la comparació entre els grups es va realitzar mitjançant ANOVA de dues vies.

Pel que fa a l'anàlisi de la distribució de la mida dels adipòcits, es va realitzar una taula de contingència que s'analitzà mitjançant el test Chi-quadrat (*Chi-square test*).

L'anàlisi estadística es va dur a terme mitjançant el programa *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software Inc.) i el nivell de significació estadística s'ha establert en  $p < 0.05$ .

## V. RESULTATS



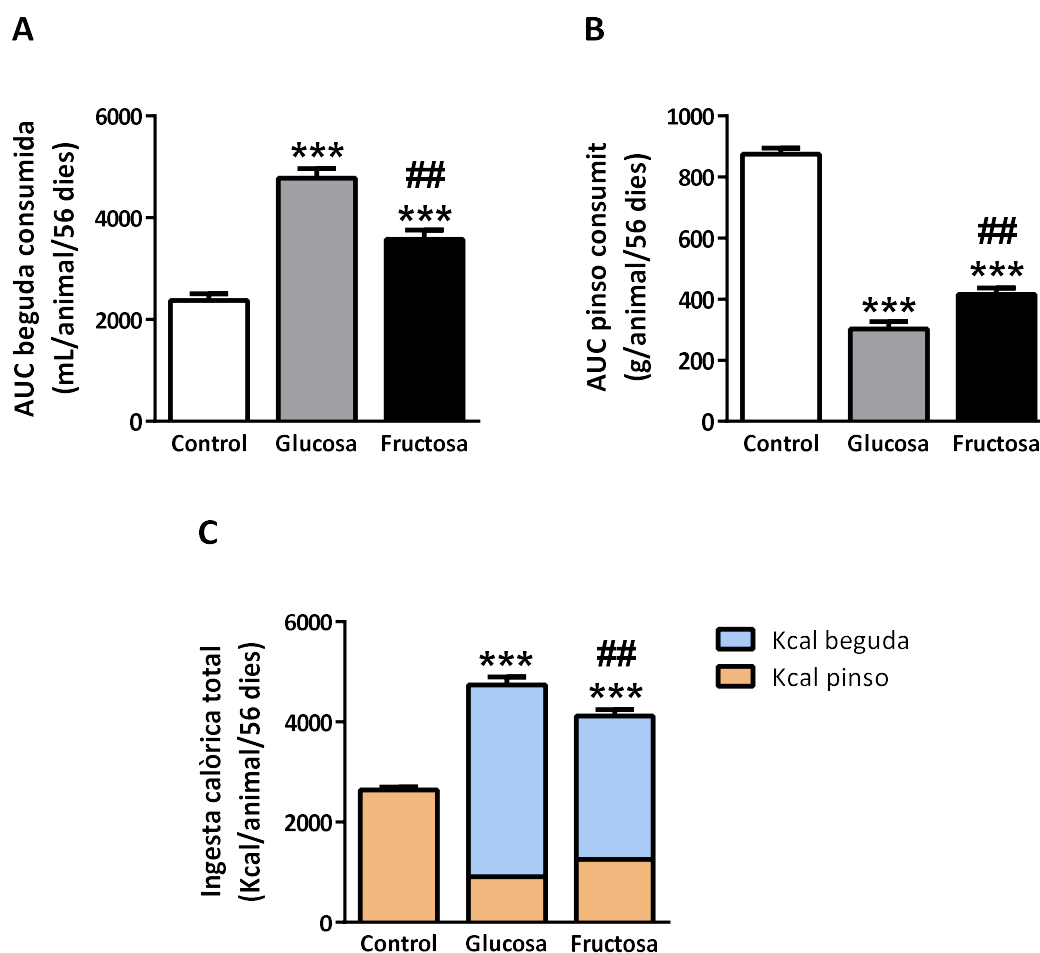


# 1. ESTUDI 1: SUPLEMENTACIÓ DE GLUCOSA I FRUCTOSA 20% (P/V) EN L'ÀIGUA DE BEGUDA DURANT 8 SETMANES EN RATES SPRAGUE-DAWLEY FEMELLA

## 1.1. Paràmetres zoomètrics

### 1.1.1. Control de la ingesta i consum calòric

La suplementació de glucosa i fructosa en l'aigua de beguda va produir un increment del consum de líquid respecte el grup control (2 i 1.5 vegades, respectivament) (Figura V-1A), mentre que la ingesta de menjar sòlid va disminuir (0.3 i 0.5 vegades, respectivament) (Figura V-1B).

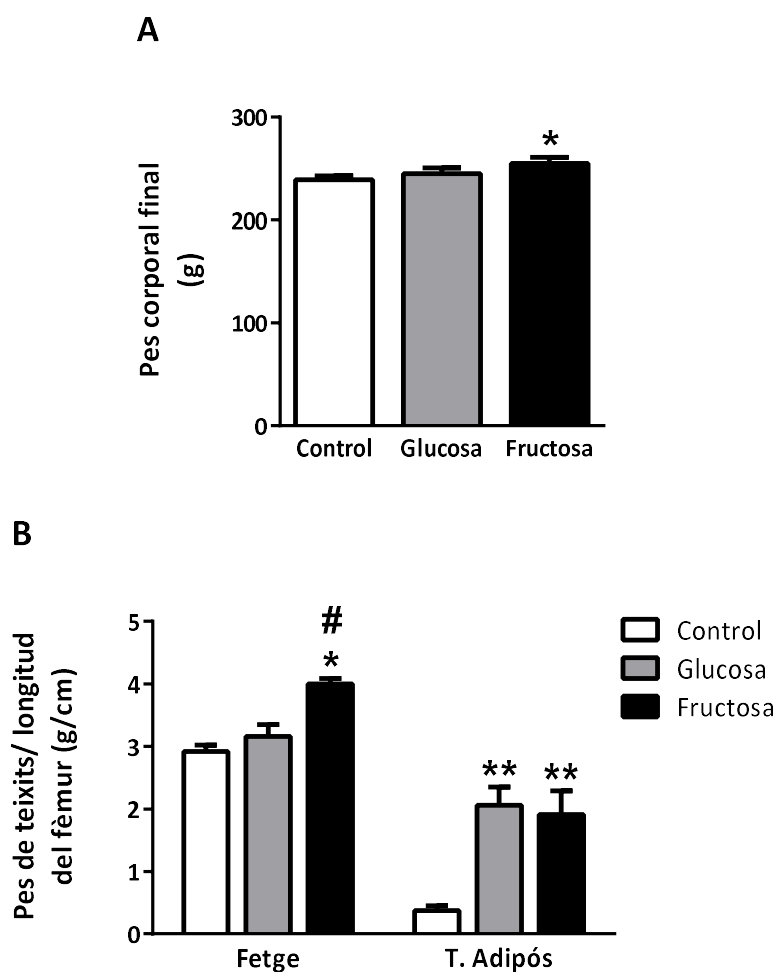


**Figura V-1.** AUC de la beguda (A) i del pinso (B) consumit per un animal durant els 56 dies de l'estudi, així com el consum calòric total, expressat en Kcal (C). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=14 rates/grup). \*\*\*p<0.001 vs control i ##p<0.01 vs glucosa.

Considerant que l'aport calòric de la glucosa i la fructosa és de 4 kcal/g i el de la dieta utilitzada és de 3.01 kcal/g, tant el grup glucosa com fructosa van presentar un increment del consum calòric total (Figura V-1C). Així doncs, la reducció de la ingesta de pinso no va ser suficient per compensar el consum energètic de les rates suplementades amb sucre. A més, cal destacar que en el grup glucosa la ingesta calòrica total va ser 1.1 vegades superior respecte el grup fructosa.

### 1.1.2. Pes corporal i de diferents teixits

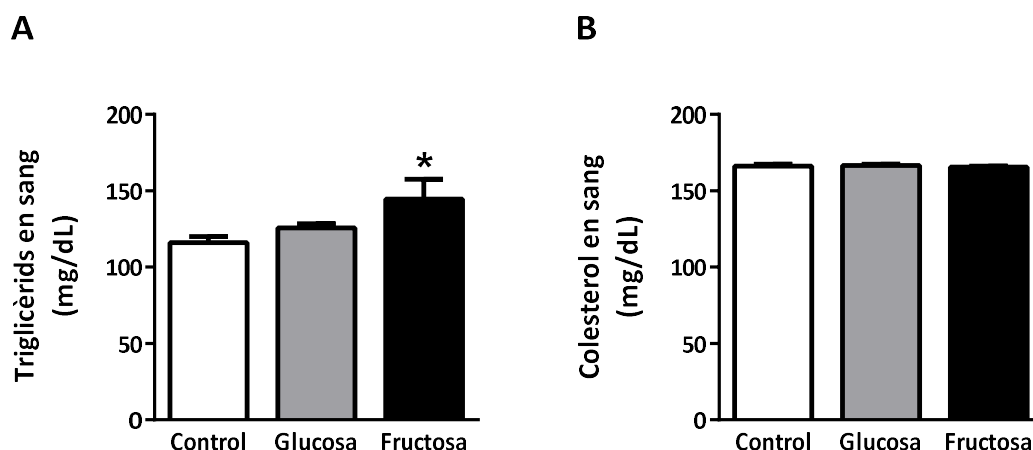
Tot i les diferències en la ingesta calòrica total, s'observà que només les rates del grup fructosa van presentar un increment del pes corporal al final de l'estudi (Figura V-2A). Pel que fa al pes del teixit adipós visceral i del fetge, es van normalitzar per la longitud del fèmur. S'observà que només el grup fructosa presentava un increment en el pes relatiu del fetge tant respecte el grup control com el grup glucosa (1.4 i 1.3 vegades, respectivament), mentre que el pes relatiu del teixit adipós era significativament superior en els dos grups suplementats amb sucre respecte el grup control (Figura V-2B).



**Figura V-2.** Pes corporal (A) i del fetge i del teixit adipós, relatiu a la longitud del fèmur (B) al final de l'estudi. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=14 rates/grup). \*p<0.05 i \*\*p<0.01 vs control i #p<0.05 vs glucosa.

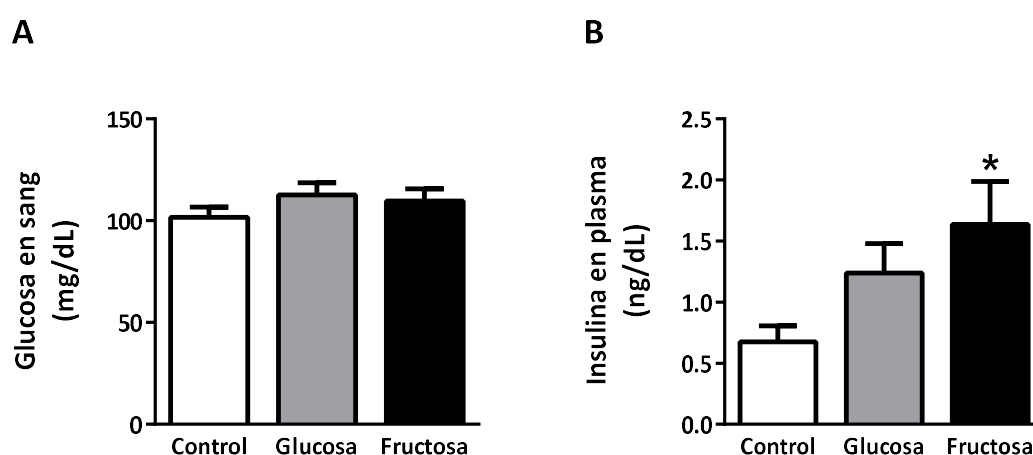
## 1.2. Anàlisi de paràmetres en sang i plasma

Respecte l'anàlisi dels lípids en sang, s'obtingué que només el grup fructosa presentava un increment significatiu dels nivells de triglicèrids (1.24 vegades respecte el control) (Figura V-3A), mentre que els nivells de colesterol no es van modificar en cap dels grups suplementats amb sucre (Figura V-3B).



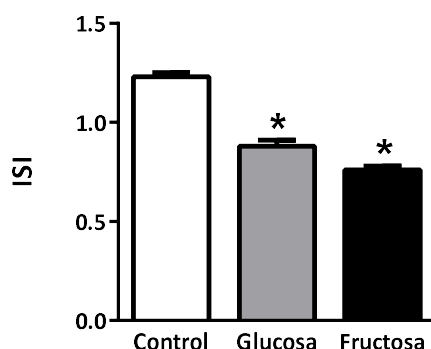
**Figura V-3.** Nivells de triglicèrids (A) i colesterol (B) en plasma al final de l'estudi. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

Els valors de glucosa en sang no presentaren diferències entre els grups (Figura V-4A) però, en canvi, en els nivells d'insulina plasmàtica sí que s'observà un increment significatiu de gairebé 2.5 vegades en el grup fructosa en comparació amb el grup control; de forma similar, els nivells d'insulina mostren una tendència a incrementar-se (p=0.07) en el grup glucosa (Figura V-4B).



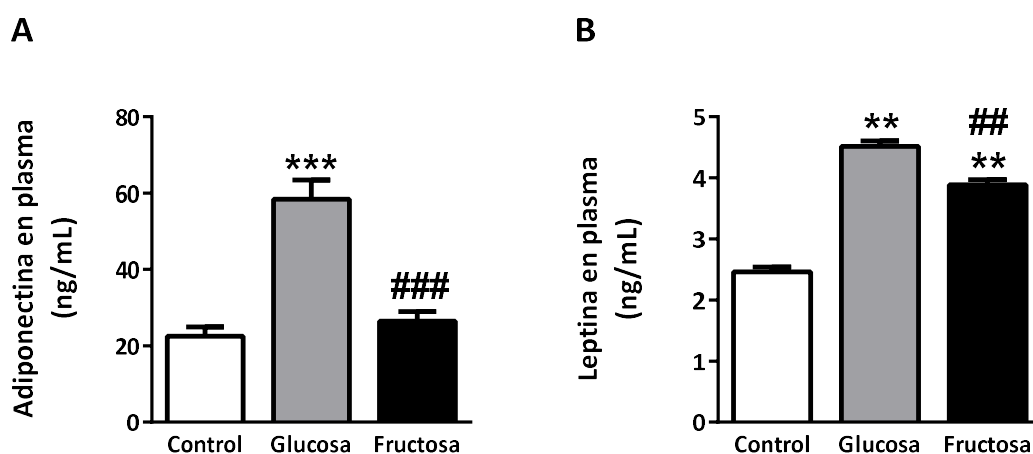
**Figura V-4.** Nivells de glucosa en sang (A) i insulina en plasma (B) al final de l'estudi. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

A partir d'aquests valors, es va obtenir l'índex de sensibilitat a la insulina (ISI, *insulin sensitivity index*), descrit inicialment per Belfiore i col. [396], i calculat com a  $[2 / (\text{concentració insulina (nM)} \times \text{concentració de glucosa } (\mu\text{M)} + 1)]$ . S'obtingué que tant el grup glucosa com el fructosa presentaven una reducció significativa d'aquest índex (Figura V-5).



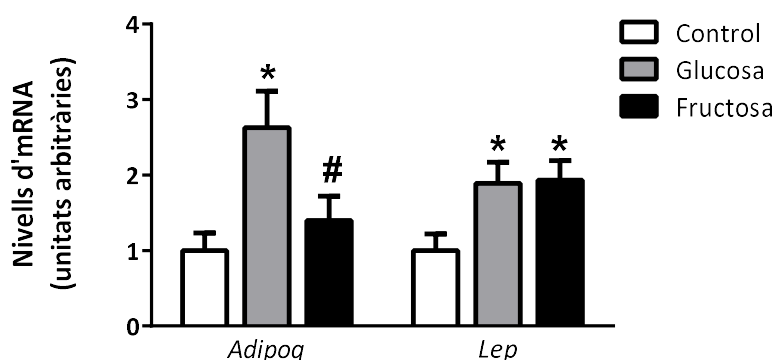
**Figura V-5.** Valors de l'índex ISI. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

Per altra banda, també es va determinar la concentració plasmàtica de dues hormones que tenen un paper molt important en la regulació de l'homeòstasi energètica: la leptina i l'adiponectina. Així, per una banda, s'obtingué que els nivells d'adiponectina en el grup glucosa eren significativament superiors tant respecte el grup control com respecte el grup fructosa (Figura V-6A). Per altra banda, els dos grups suplementats amb sucre presentaven un increment dels nivells de leptina plasmàtica en front el grup control (Figura V-6B). A més, aquest augment va ser significativament superior en el grup glucosa respecte el fructosa.



**Figura V-6.** Concentració plasmàtica d'adiponectina (A) i leptina (B) al final de l'estudi. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM (n=8 rates/grup). \*\*p<0.01 i \*\*\*p<0.001 vs control, , ##p<0.01 i ###p<0.001 vs glucosa.

Tenint en compte que aquestes dues hormones són alliberades pel teixit adipós, es va analitzar la seva expressió gènica en aquest teixit. Això va permetre corroborar els resultats obtinguts en plasma, ja que també s'observà un augment de l'expressió d'adiponectina només en el grup glucosa, mentre que l'increment de l'expressió de leptina s'observà en els dos grups suplementats amb sucre (Figura V-7).



**Figura V-7.** Nivells d'mRNA d'*Adipoq* i *Lep* en el teixit adipós. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control i #p<0.05 vs glucosa.

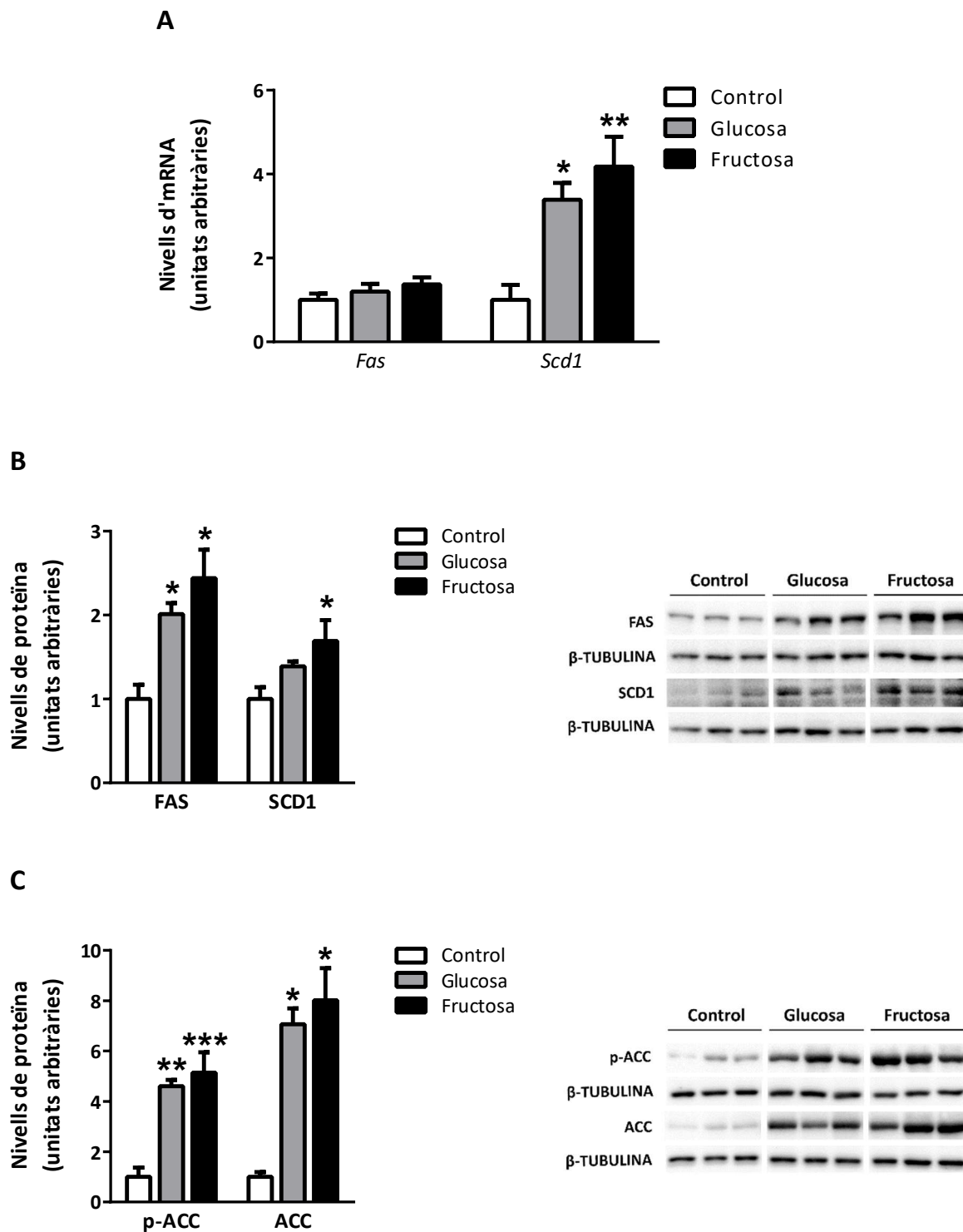
### 1.3. Efectes en el metabolisme lipídic

#### 1.3.1. Efectes en la lipogènesi

La hipertrigliceridèmia i l'increment del pes del fetge va conduir a l'anàlisi de l'expressió gènica i proteica d'enzims relacionats amb el procés de la lipogènesi hepàtica.

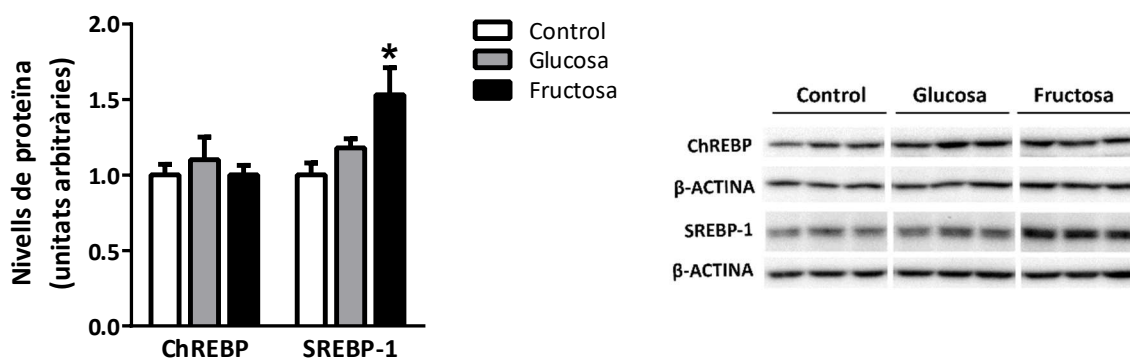
Pel que fa a l'anàlisi dels nivells d'mRNA, malgrat no s'obtingueren diferències significatives en els nivells de l'enzim FAS, sí que s'observà un increment de l'expressió d'SCD1 en els grups glucosa i fructosa en front el grup control (Figura V-8A). En el cas de l'expressió proteica, analitzada mitjançant la tècnica *Western Blot*, s'obtingué que els nivells de FAS i d'SCD1 presentaven un increment tant en el grup glucosa com en el fructosa (Figura V-8B). No obstant, l'augment d'SCD1 en el grup glucosa no va assolir significació estadística.

També es va determinar l'expressió proteica de la forma total i fosforilada (Ser<sup>79</sup>) de la proteïna ACC. En ambdós casos, es va observar un increment en els grups suplementats amb sucre (Figura V-8C), fet que suggereix que el grau d'activació d'ACC no es va modificar.



**Figura V-8.** Nivells d'mRNA de *Fas* i *Scd1* (A), així com nivells de les proteïnes FAS i SCD1 (B), i de la forma total i fosforilada d'ACC (Ser<sup>79</sup>) (C) en teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=8 rates/grup per l'expressió gènica i n=4-5 rates/grup per l'expressió proteica). \*p<0.05, \*\*p<0.01 i \*\*\*p<0.001 vs control.

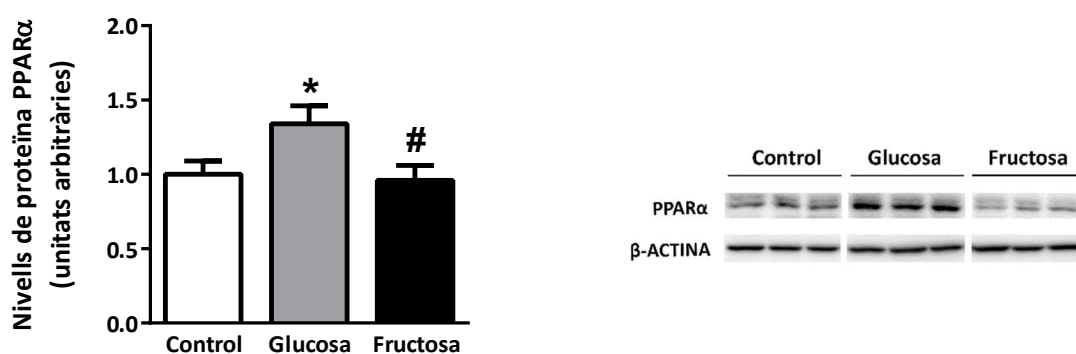
Per altra banda, l'expressió dels gens lipogènics és principalment regulada pels factors de transcripció SREBP-1 i ChREBP. L'anàlisi de la seva expressió proteica en extractes nuclears hepàtics va mostrar que no hi havia canvis en l'expressió de ChREBP entre els grups, però en canvi sí que s'observà un increment dels nivells proteics d'SREBP-1 en el grup fructosa respecte el control (Figura V-9).



**Figura V-9.** Nivells de les proteïnes ChREBP i SREBP-1 en mostres hepàtiques d'extracte nuclear. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=4-5 rates/grup). \* $p < 0.05$  vs control.

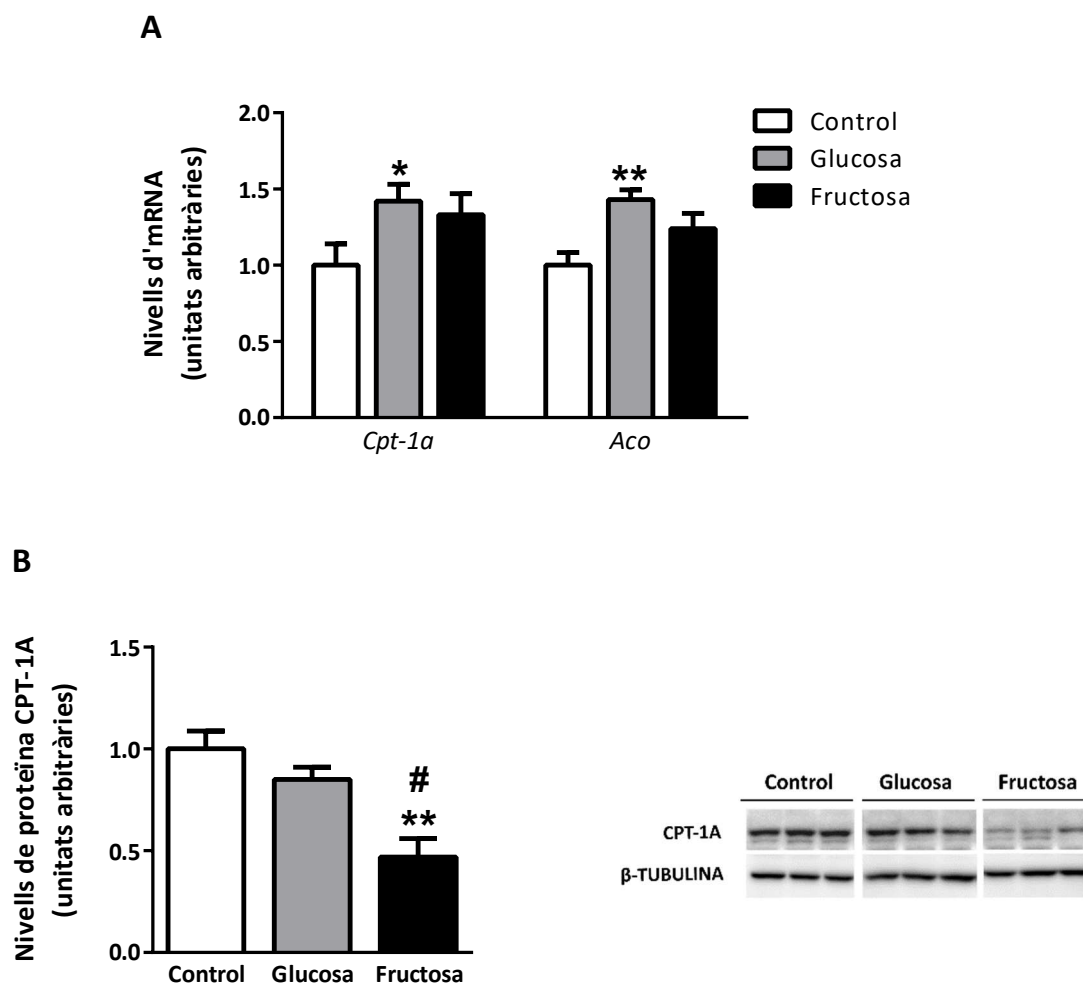
### 1.3.2. Efectes en la $\beta$ -oxidació

Un dels principals reguladors de la  $\beta$ -oxidació és el factor de transcripció PPAR $\alpha$ , el qual promou l'activació de gens involucrats en la  $\beta$ -oxidació mitocondrial i peroxisòmica. En analitzar els seus nivells proteics en extractes nuclears hepàtics s'observà que només el grup glucosa presentava un increment significatiu respecte el grup control (Figura V-10).



**Figura V-10.** Nivells de la proteïna PPAR $\alpha$  en mostres hepàtiques d'extracte nuclear. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=4-5 rates/grup). \* $p < 0.05$  vs control i # $p < 0.05$  vs glucosa.

En aquest mateix sentit, la determinació de l'expressió gènica de gens diana de PPAR $\alpha$ , *Cpt-1a* i *Aco*, van mostrar un increment significatiu en els animals del grup glucosa (Figura V-11A). No obstant, en l'anàlisi dels nivells proteics de CPT-1A, no es van observar diferències entre el grup glucosa i el control, però en canvi sí, una disminució significativa en el grup fructosa (0.5x) respecte el grup control i glucosa (Figura V-11B).

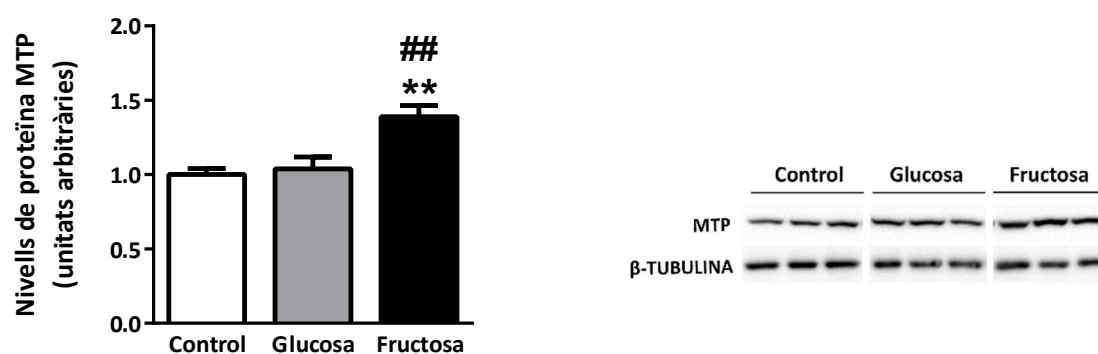


**Figura V-11.** Nivells d'mRNA de *Cpt-1a* i *Aco* (A), així com nivells de la proteïna CPT-1A (B) en teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=8 rates/grup per l'expressió gènica i n=4-5 rates/grup per l'expressió proteica). \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs control i #p<0.05 vs glucosa.



### 1.3.3. Efectes en el transport de triglicèrids

Els nivells de triglicèrids plasmàtics també vénen condicionats per l'exportació de lípids que realitza el fetge. Així, es va determinar els nivells proteics d'MTP, una proteïna necessària per la secreció de VLDL en el fetge. S'obtingué que el grup suplementat amb fructosa en l'aigua de beguda presentava un increment significatiu del nivells d'MTP comparat amb els altres dos grups (Figura V-12).



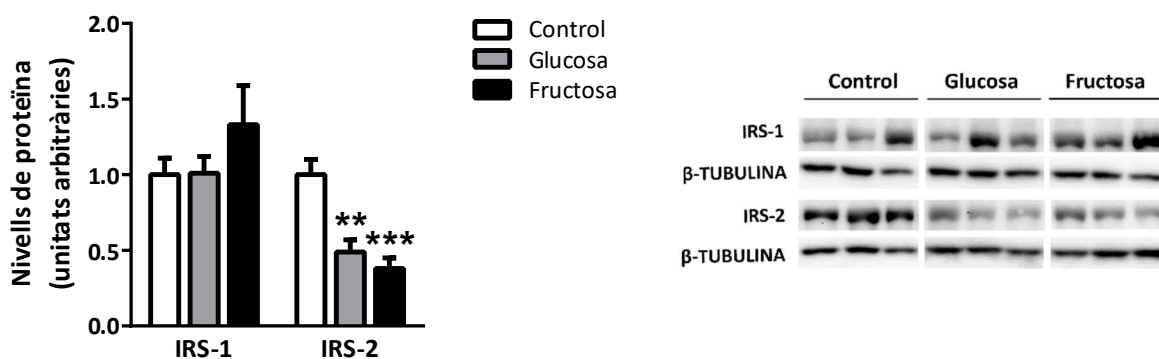
**Figura V-12.** Nivells de la proteïna MTP en teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=4-5 rates/grup). \*\*p<0.01 vs control i ##p<0.01 vs glucosa.

### 1.4. Via de senyalització de la insulina

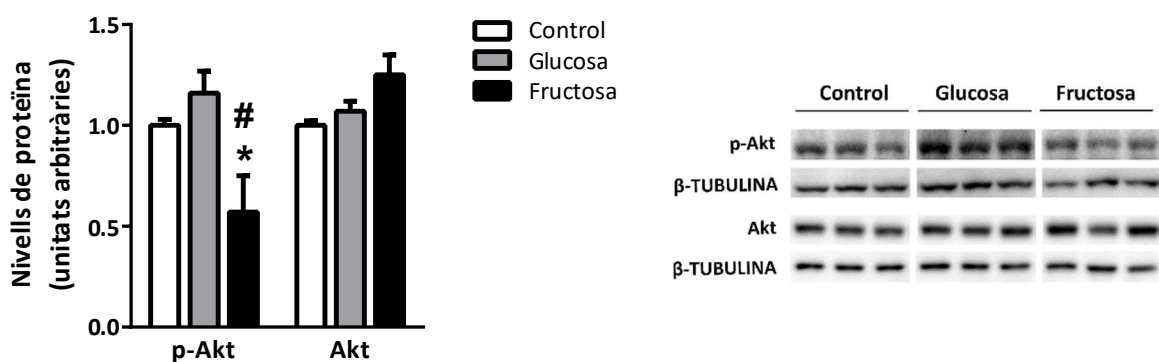
La disminució de la sensibilitat a la insulina en els grups glucosa i fructosa, observada a través de l'ISI (Figura V-5), suggereix una alteració de la via de senyalització de la insulina. Per aquest motiu, es va analitzar l'expressió proteica d'IRS-1, IRS-2 i de la forma total i fosforilada (Ser<sup>473</sup>) d'Akt en el fetge i l'aorta.

Respecte el fetge, no es modificaren els nivells d'IRS-1, però sí que s'observà una reducció de l'expressió proteica d'IRS-2 en els animals suplementats amb glucosa i fructosa (0.4 i 0.5 vegades, respectivament) (Figura V-13A). La quantitat d'Akt fosforilada va ser significativament menor en el fetge dels animals del grup fructosa, mentre que Akt total no es va veure alterada per la ingesta de sucres (Figura V-13B).

**A**

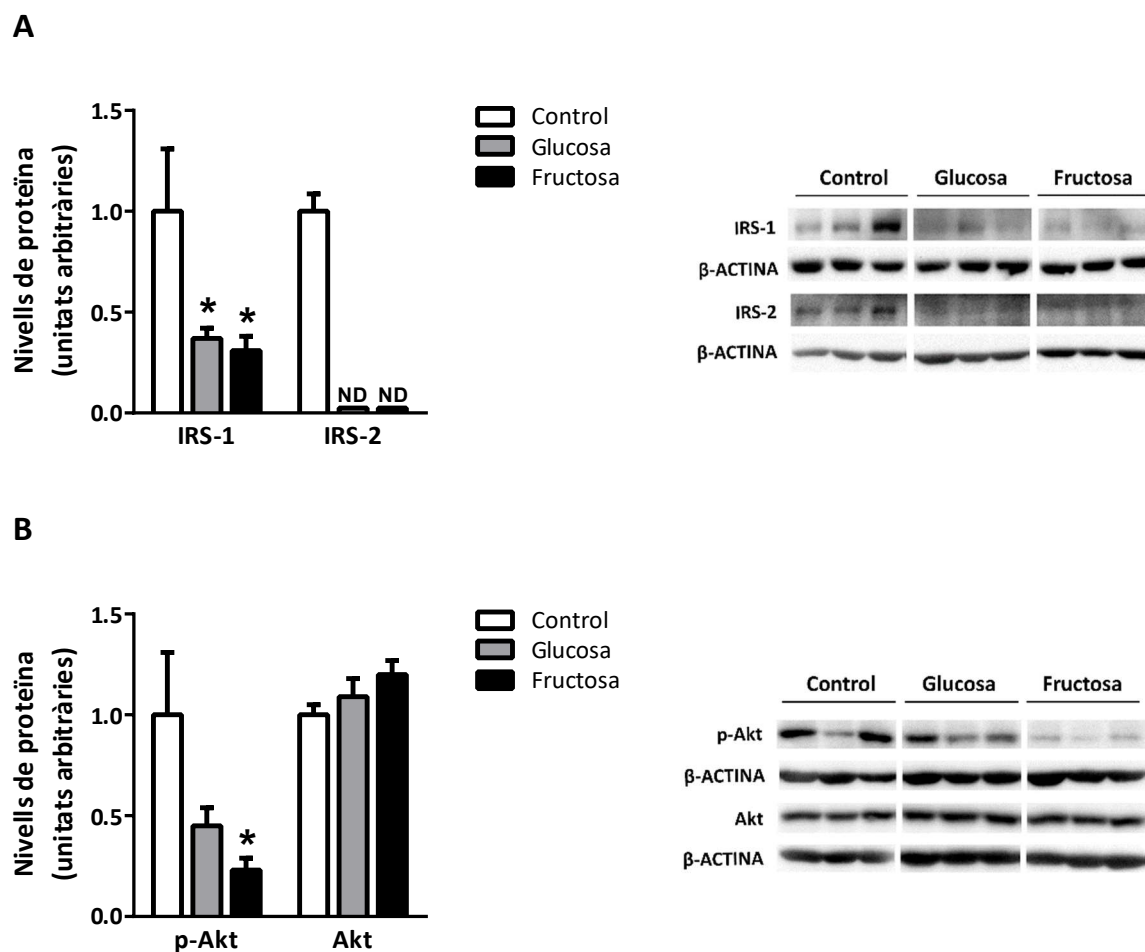


**B**



**Figura V-13.** Nivells de les proteïnes IRS-1 i IRS-2 (A) i p-Akt (Ser<sup>473</sup>) i Akt (B) en teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05, \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 vs control i #p<0.05 vs glucosa.

Pel que fa a l'aorta, l'expressió proteica tan d'IRS-1 com d'IRS-2 es va veure reduïda després de la suplementació amb sucres en l'aigua de beguda (Figura V-14A); d'altra banda, el grau de fosforilació d'Akt només va disminuir significativament en el grup fructosa (Figura V-14B).



**Figura V-14.** Nivells de les proteïnes IRS-1 i IRS-2 (A) i p-Akt (Ser<sup>473</sup>) i Akt (B) en aorta. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

## 1.5. Estudi de la reactivitat vascular

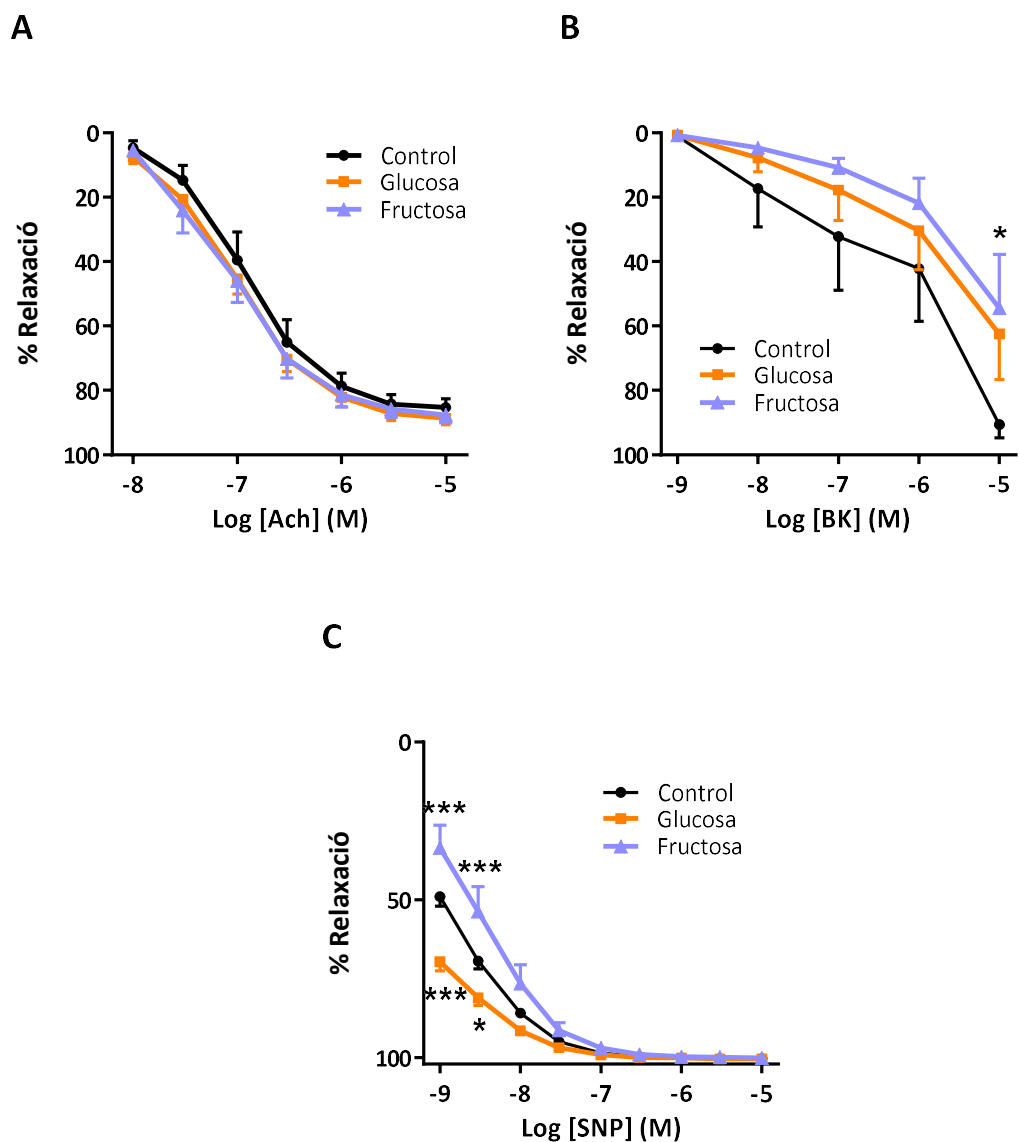
L'estudi de la reactivitat vascular es va realitzar a través de la valoració de corbes concentració-resposta d'anells aòrtics exposats a diferents agents vasoactius, així com a través de l'anàlisi de l'expressió proteica i gènica de molècules implicades en les vies que indueixen la relaxació vascular.

### 1.5.1. Estudi de la resposta vasodilatadora

La vasodilatació dependent de l'endoteli, regulada a través de receptors específics, es va valorar mitjançant corbes concentració-resposta a Ach i BK. Pel que fa a les respostes a Ach, no s'obtingueren diferències entre els grups, ni en la sensibilitat (mesurada a través de  $pD_2$ ,  $-\log(EC_{50})$ ) ni en l' $E_{m\grave{a}x}$  (Figura V-15A, Taula V-1). De manera similar, la sensibilitat i l' $E_{m\grave{a}x}$  a BK no es van veure alterats, però en canvi, sí que s'observà un desplaçament cap a la dreta

de les corbes de concentració-resposta a BK de les aortes del grup suplementat amb fructosa respecte el control (Figura V-15B, Taula V-1).

Per altra banda, l'estudi de la vasodilatació independent de l'endoteli (EIDV, *endothelium-independent vasodilatation*) es va realitzar a través de respostes induïdes per SNP. Tot i que l' $E_{m\grave{a}x}$  va ser similar en tots els grups (Taula V-1), la suplementació amb glucosa va augmentar significativament la resposta vasodilatadora i la sensibilitat dels anells aòrtics a SNP, mentre que la suplementació amb fructosa va disminuir-la (Figura V-15C).



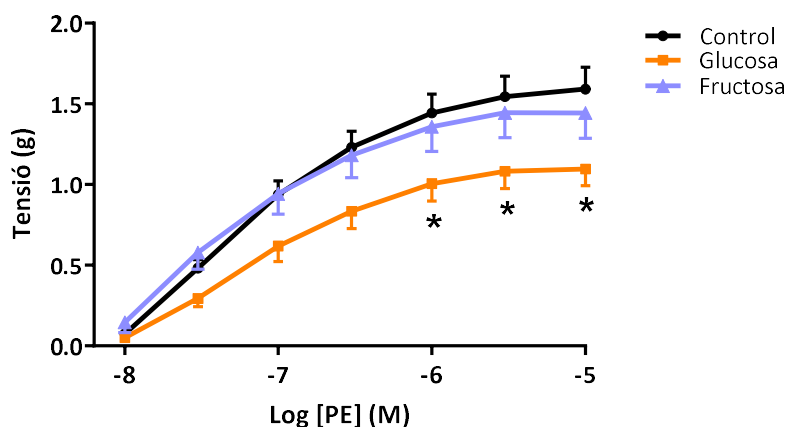
**Figura V-15.** Corbes concentració-resposta a Ach (A), BK (B) i SNP (C) en anells aòrtics contrèts prèviament amb PE (2  $\mu$ M) (A i B) i U46619 (100 nM) (C). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=5-8 rates/grup). \* $p < 0.05$  i \*\*\* $p < 0.001$  vs control.

		n	pD <sub>2</sub>	E <sub>màx</sub> (%)
Ach	Control	8	6.75 ± 0.15	85.21 ± 2.63
	Glucosa	8	6.86 ± 0.10	88.59 ± 2.12
	Fructosa	8	6.88 ± 0.15	87.59 ± 2.46
BK	Control	5	6.27 ± 0.51	90.51 ± 4.26
	Glucosa	6	5.00 ± 0.80	62.48 ± 14.22
	Fructosa	5	4.58 ± 0.69	54.38 ± 16.60
SNP	Control	8	8.97 ± 0.070	100.23 ± 0.277
	Glucosa	8	9.51 ± 0.10**	100.01 ± 0.19
	Fructosa	8	8.64 ± 0.14	100.01 ± 0.19

**Taula V-1.** pD<sub>2</sub> i E<sub>màx</sub> de les respostes vasodilatadores a Ach, BK i SNP. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM (n=5-8 rates/grup). \*\*p<0.01 vs control.

### 1.5.2. Estudi de la resposta vasoconstrictora

La resposta vasoconstrictora es va determinar a través de la valoració de la resposta dels anells aòrtics a concentracions creixents de PE. La ingesta de fructosa no va alterar la resposta contràctil a PE. No obstant, la suplementació amb glucosa va reduir significativament la contracció dels anells aòrtics en comparació amb el grup control (Figura V-16, Taula V-2).

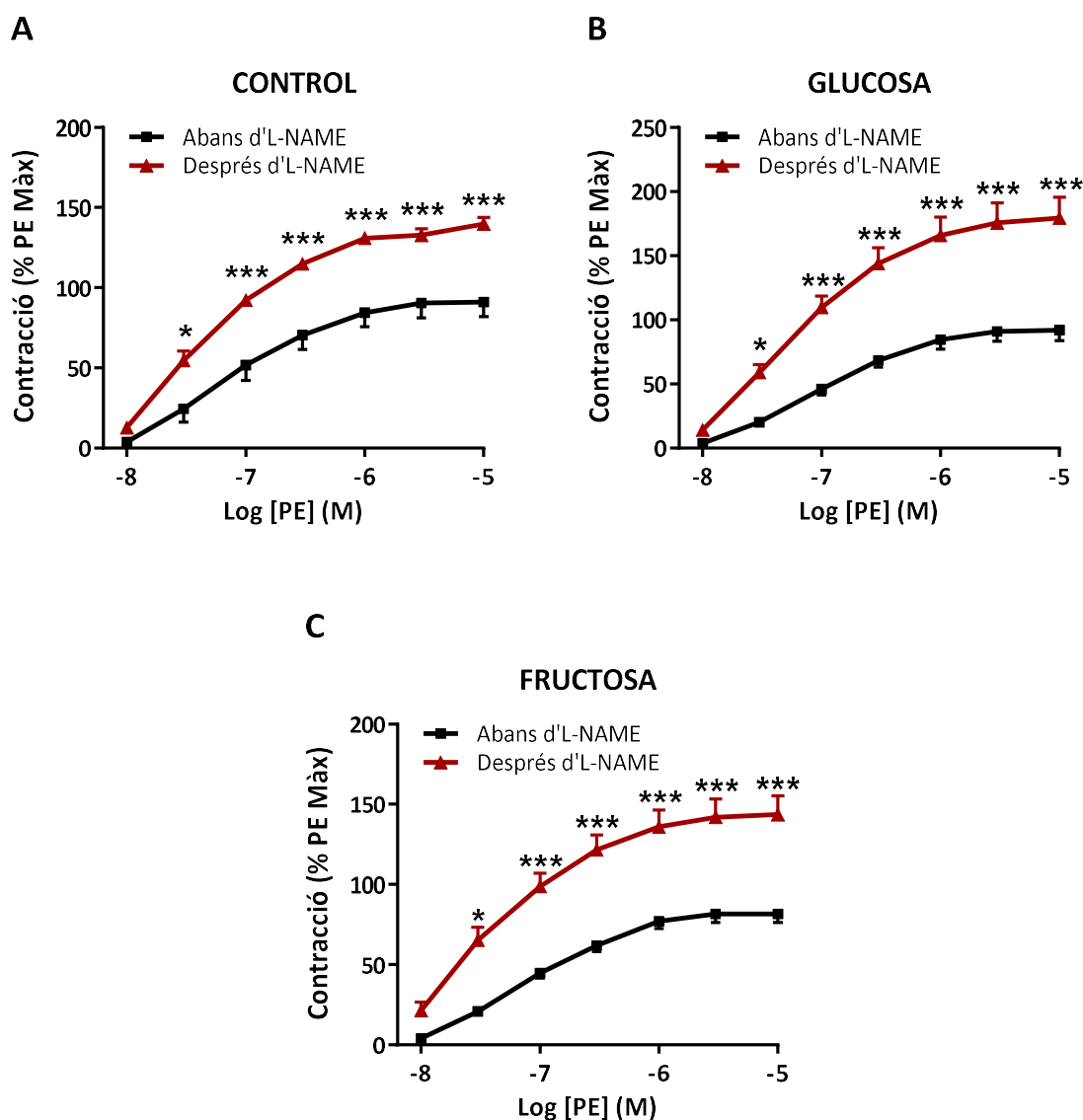


**Figura V-16.** Corbes concentració-resposta a PE en anells aòrtics. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM (n=7-8 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

	n	pD <sub>2</sub>	T <sub>màx</sub> (g)	
PE	Control	7	7.15 ± 0.08	1.60 ± 0.15
	Glucosa	8	7.02 ± 0.08	1.10 ± 0.10*
	Fructosa	7	7.32 ± 0.1	1.54 ± 0.14

**Taula V-2.** pD<sub>2</sub> i T<sub>màx</sub> de la resposta vasoconstrictora a PE. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM (n=7-8 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

Per tal d'estudiar el paper de l'NO basal, es van comparar corbes concentració-resposta a PE realitzades abans i després de l'addició d'L-NAME, un inhibidor de la NOS, en presència d'indometacina, inhibidor de la cicloxigenasa. La incubació dels anells aòrtics amb L-NAME va produir un increment de la resposta contràctil a PE en tots els grups (Figura V-17). No obstant, la diferència entre l'AUC de la primera i la segona corba ( $\Delta$ AUC), només va ser significativament superior en les aortes de les rates suplementades amb glucosa en l'aigua de beguda (Taula V-3).



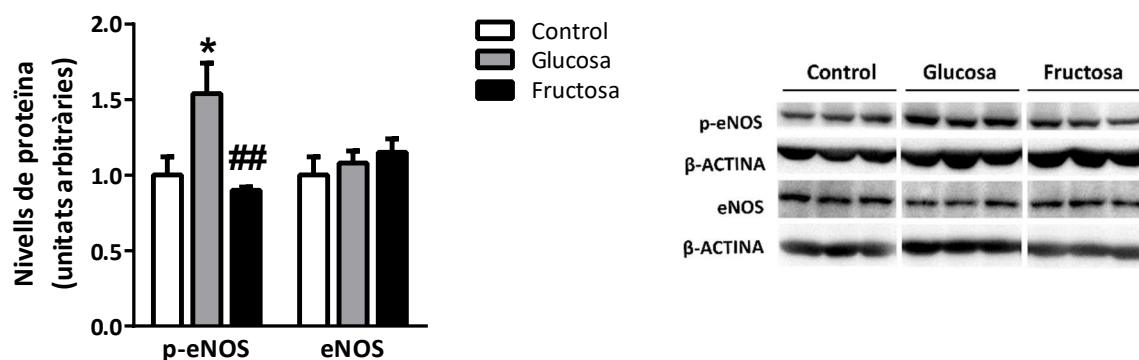
**Figura V-17.** Corbes concentració-resposta a PE abans i després de la incubació amb L-NAME (200 µM) en anells aòrtics en el grup control (A), glucosa (B) i fructosa (C). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=7-8 rates/grup). \*p<0.05 i \*\*\*p<0.001 vs control.

		$E_{m\grave{a}x}$ (%)	$T_{m\grave{a}x}$ (g)	$pD_2$	$\Delta AUC$
Control	Abans d'L-NAME	91,10 ± 9,19	1,48 ± 0,24	7,05 ± 0,09	-
	Després d'L-NAME	139,70 ± 4,00 <sup>+</sup>	2,21 ± 0,18 <sup>++</sup>	7,30 ± 0,07	116,90 ± 21,49
Glucosa	Abans d'L-NAME	92.05 ± 8.15	0.97 ± 0.07	6.98 ± 0.06	-
	Després d'L-NAME	179.36 ± 16.07 <sup>****</sup>	1.86 ± 0.08 <sup>+++</sup>	7.20 ± 0.06	197.24 ± 30.78 <sup>*</sup>
Fructosa	Abans d'L-NAME	81.63 ± 5.32	1.26 ± 0.16	7.05 ± 0.05	-
	Després d'L-NAME	143.60 ± 11.62 <sup>++</sup>	2.16 ± 0.17 <sup>++</sup>	7.38 ± 0.08	158.90 ± 19.75

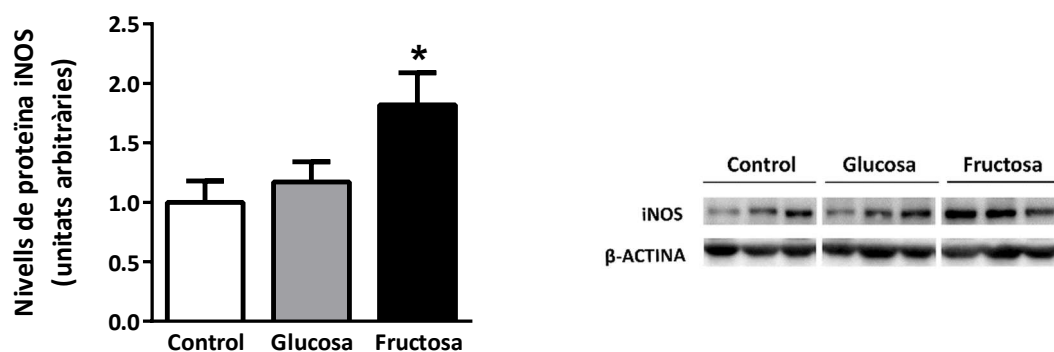
**Taula V-3.**  $E_{m\grave{a}x}$ ,  $T_{m\grave{a}x}$  i  $pD_2$  de la resposta vasoconstrictora a PE abans i després de la incubació amb L-NAME (200  $\mu$ M) en anells aòrtics i  $\Delta AUC$  entre les dues corbes. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=7-8 rates/grup). \* $p$ <0.05 vs control, <sup>+</sup> $p$ <0.05, <sup>++</sup> $p$ <0.05 i <sup>+++</sup> $p$ <0.001 vs abans d'L-NAME.

### 1.5.3. Estudi dels mecanismes moleculars relacionats amb la relaxació vascular

Pel que fa a l'estudi dels mecanismes relacionats amb la relaxació vascular, en primer lloc, es va voler determinar per quin mecanisme l'alliberament d'NO s'incrementava en les rates del grup glucosa. Així, es van analitzar els nivells proteics d'eNOS i iNOS. S'obtingué que el grau de fosforilació d'eNOS (Ser<sup>1177</sup>), i per tant l'activació d'eNOS, estava augmentada en el grup glucosa respecte el grup control i fructosa, mentre que els nivells d'eNOS no presentaven diferències entre els grups (Figura V-18). Per altra banda, l'expressió proteica d'iNOS va ser superior només en el grup fructosa (Figura V-19).



**Figura V-18.** Nivells de les proteïnes p-eNOS (Ser<sup>1177</sup>) i eNOS en aorta. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=4-5 rates/grup). \* $p$ <0.05 vs control i ## $p$ <0.01 vs glucosa.

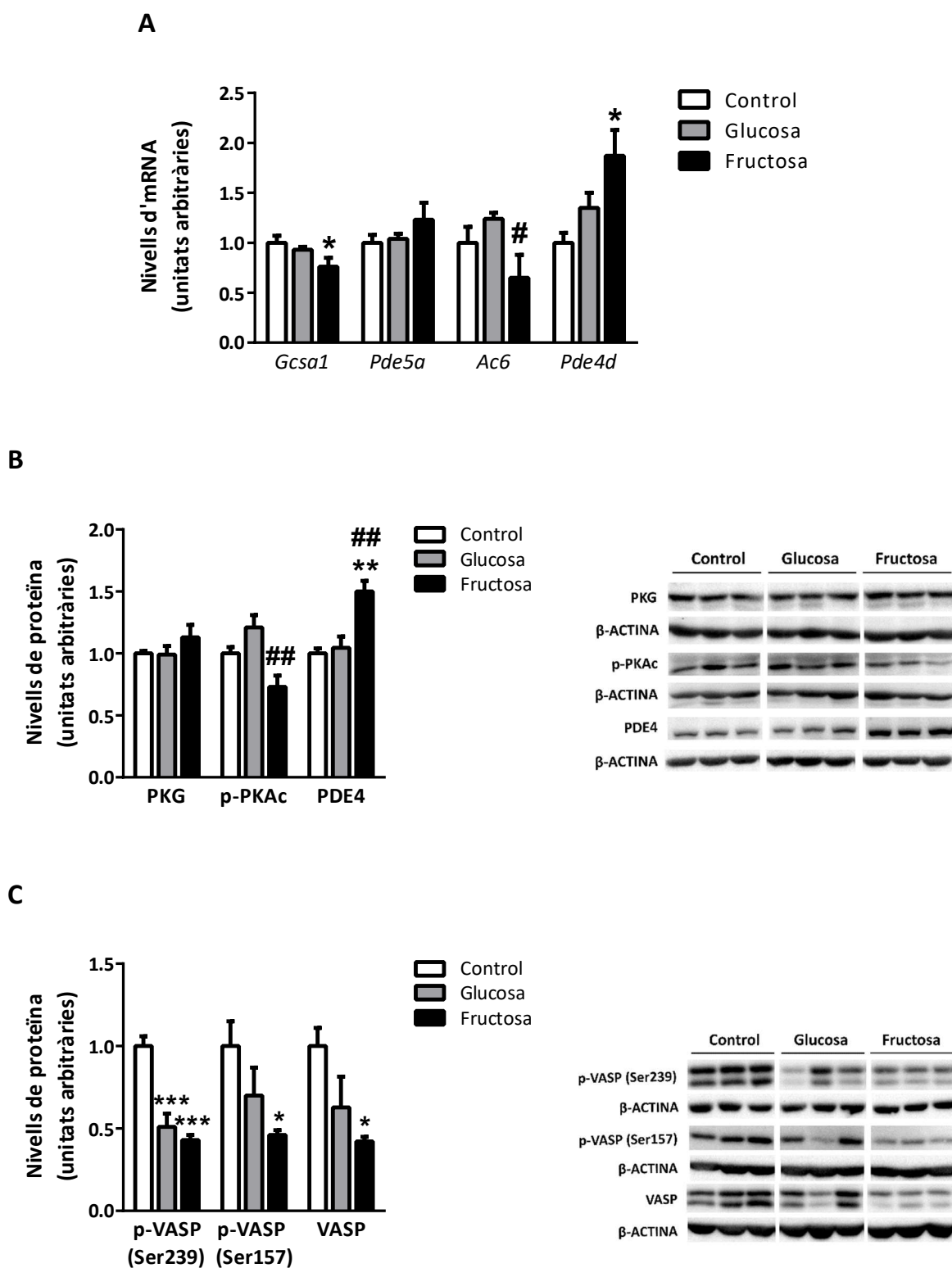


**Figura V-19.** Nivells de la proteïna iNOS en aorta. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

A continuació, es van investigar mecanismes que poguessin explicar les diferències de les respostes vasculars entre els grups. La relaxació dependent d'NO és principalment controlada per la senyalització de cGMP, la qual indueix l'activació de PKG, que resulta en una fosforilació de la proteïna VASP en la posició Ser<sup>239</sup>. L'anàlisi dels nivells d'mRNA de *Gcsa1* van mostrar una disminució en el grup fructosa respecte el control (Figura V-20A). No obstant, no es van veure diferències entre els grups en l'anàlisi de l'expressió gènica de *Pde5* (Figura V-20A), la fosfodiesterasa que específicament catalitza la hidròlisi de cGMP, ni de l'expressió proteica de PKG (Figura V-20B). Tot i això, la quantitat de p-VASP (Ser<sup>239</sup>) es va veure reduïda en els dos grups suplementats amb sucre, mentre que els nivells de VASP total només es van veure disminuïts en el grup fructosa (Figura V-20C).

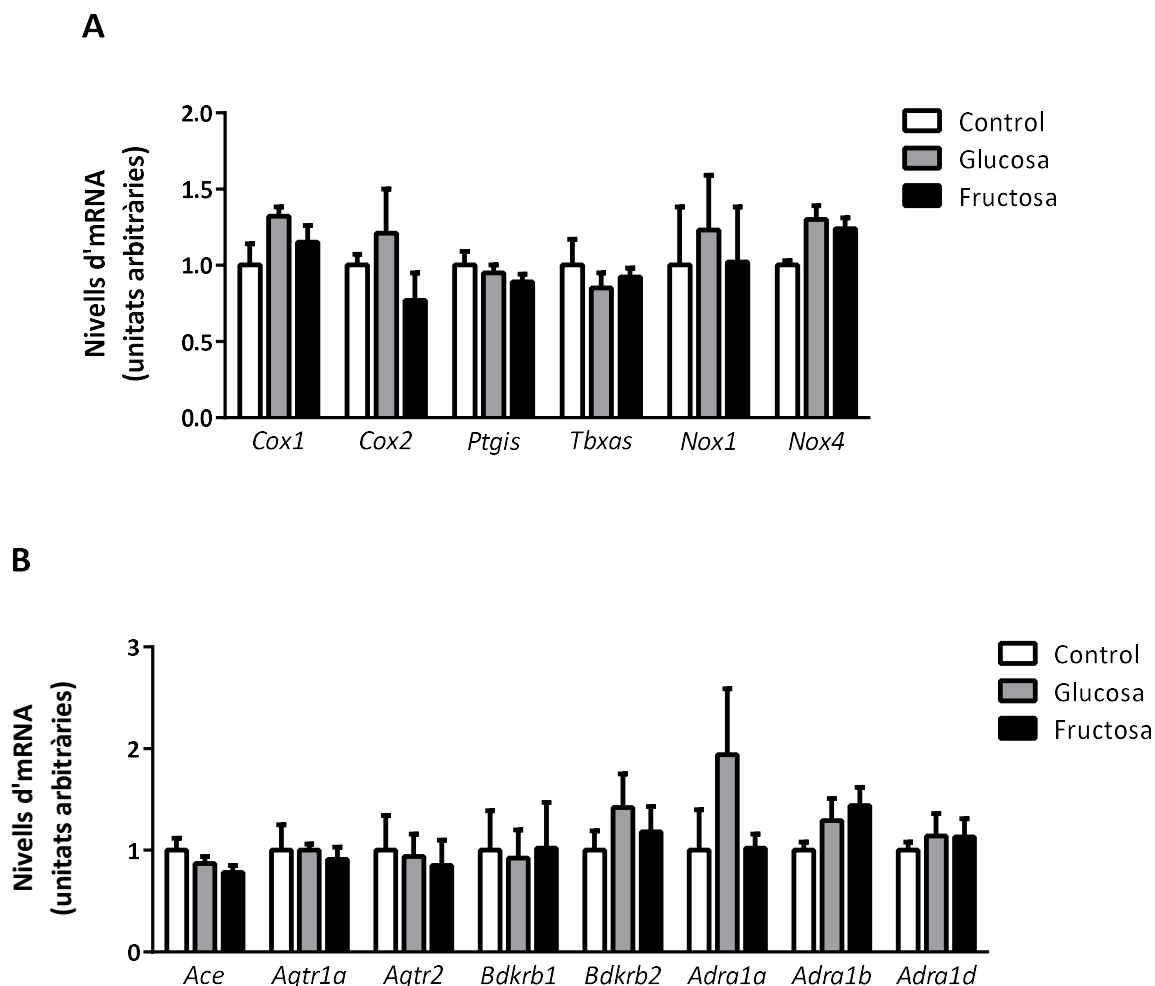
Respecte la via independent d'NO, en els vasos sanguinis grans, aquesta és principalment controlada pels nivells de cAMP que condueix a una increment de la fosforilació de la proteïna VASP en la posició Ser<sup>157</sup>. En el present estudi s'obtingué que els nivells d'mRNA d'*Ac6* (Figura V-20A) i l'expressió proteica de la fosforilació de PKA-c (Thr<sup>197</sup>) (Figura V-20B) no eren modificats per la suplementació de sucres respecte els animals control, tot i que el grup fructosa va mostrar una reducció dels nivells comparat amb el grup glucosa. Per altra banda, la ingesta de fructosa va produir un increment de l'expressió gènica i proteica de PDE4 (Figura V-20B), la fosfodiesterasa que catalitza principalment la hidròlisi de cAMP. Així mateix, la fosforilació de VASP en la posició Ser<sup>157</sup> es va veure reduïda significativament només en el grup fructosa (Figura V-20C).





**Figura V-20.** Nivells d'mRNA de *Gcsa1*, *Pde5a*, *Ac6* i *Pde4d* (A), així com nivells de les proteïnes PKG, p-PKAc (Thr<sup>197</sup>) i PDE4 (B) i p-VASP (Ser<sup>239</sup> i Ser<sup>157</sup>) i VASP (C) en aorta. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM ( $n=8$  rates/grup per l'expressió gènica i  $n=4-5$  rates/grup per l'expressió proteica). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  i \*\*\* $p<0.001$  vs control i # $p<0.05$  i ## $p<0.01$  vs glucosa.

Finalment, es van mesurar els nivells d'mRNA de diversos gens de vies involucrades en la reactivitat vascular: la síntesi de prostaglandines (*Cox1*, *Cox2*, *Ptgis* i *Tbxas*) i de ROS (*Nox1* i *Nox4*) (Figura V-21A), així com enzims i receptors de l'angiotensina (*Ace*, *Agtr1a* i *Agtr2*) i receptors de la BK (*Bdkrb1* i *Bdkrb2*) i  $\alpha$ -adrenèrgics (*Adra1a*, *Adra1b* i *Adra1d*) (Figura V-20B). No obstant, en cap dels casos s'observaren diferències de l'expressió gènica entre els grups.



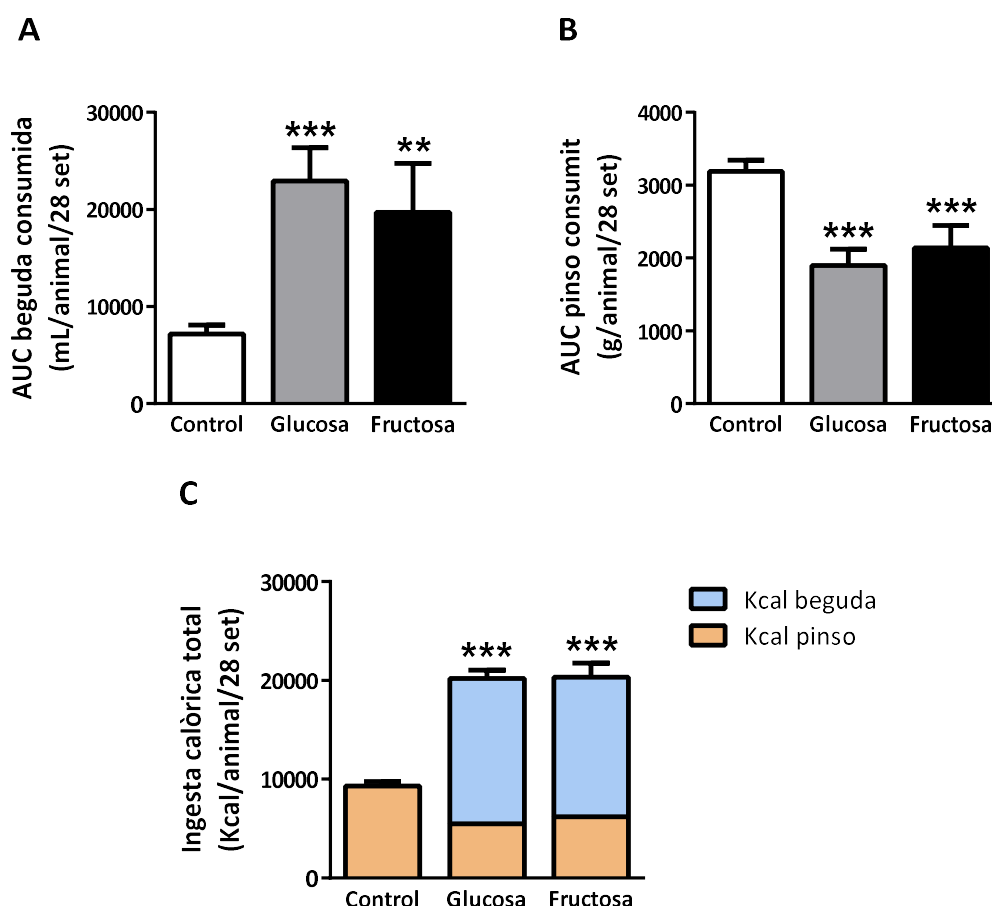
**Figura V-21.** Nivells d'mRNA de *Cox1*, *Cox2*, *Ptgis*, *Tbxas*, *Nox1* i *Nox4* (A), així com d'*Ace*, *Agtr1a*, *Agtr2*, *Bdkrb1*, *Bdkrb2*, *Adra1a*, *Adra1b* i *Adra1d* (B) en aorta. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM (n=8 rates/grup).

## 2. ESTUDI 2: SUPLEMENTACIÓ DE GLUCOSA I FRUCTOSA 10% (P/V) EN L'ÀGUA DE BEGUDA DURANT 28 SETMANES EN RATES SPRAGUE-DAWLEY FEMELLA

### 2.1. Paràmetres zoomètrics

#### 2.1.1. Control de la ingesta i consum calòric

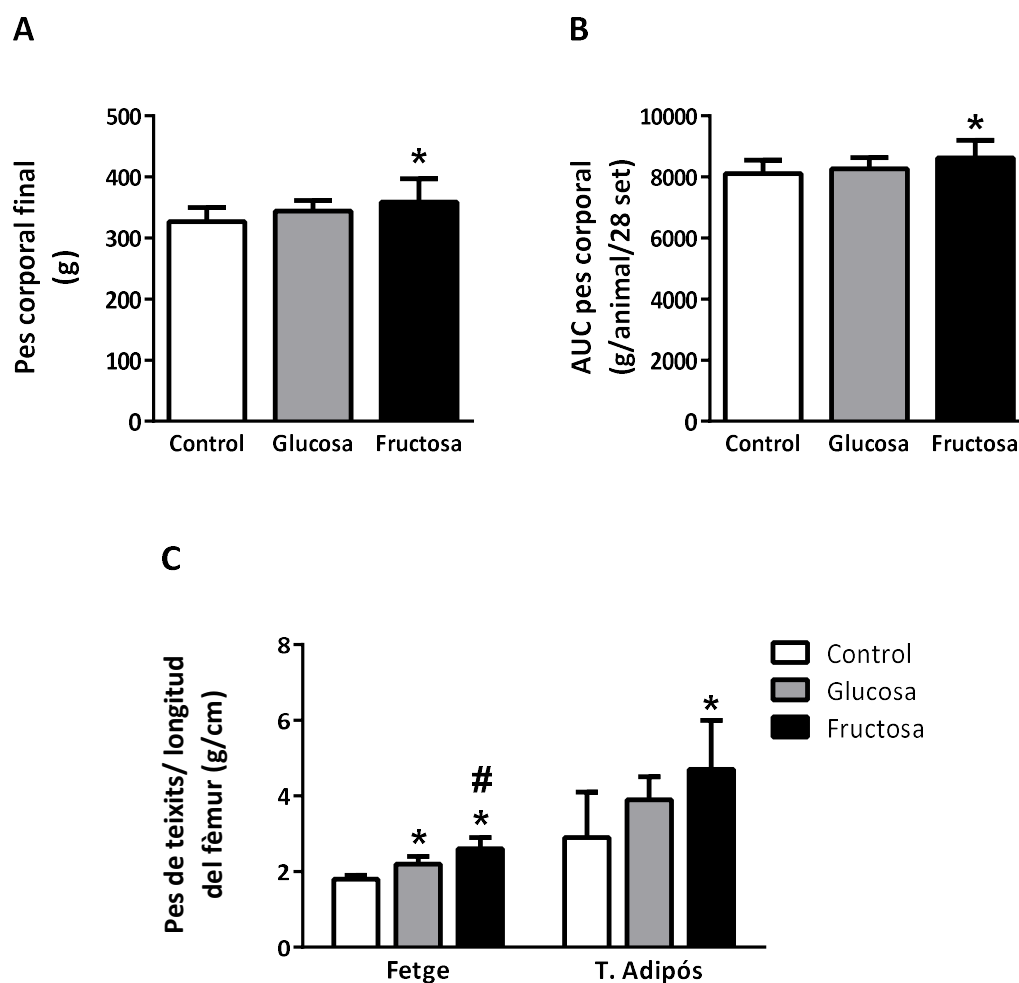
De manera similar a l'estudi 1, el consum de beguda va ser superior en els grups suplementats amb glucosa i fructosa (3.2 i 2.7 vegades, respectivament) (Figura V-22A), mentre que s'observà una disminució del consum de pinso d'aquests grups (0.6 i 0.7, respectivament) (Figura V-22B). No obstant, aquesta reducció no va ser suficient per compensar la ingesta calòrica total, de manera que els animals del grup glucosa i els del grup fructosa van ingerir 1.6 i 1.5 vegades més calories que el grup control, respectivament. Cal destacar que, entre el grup glucosa i fructosa no hi va haver diferències pel que fa a la ingesta de beguda, pinso ni el consum calòric total (Figura V-22C).



**Figura V-22.** AUC de la beguda (A) i del pinso (B) consumit per un animal durant les 28 setmanes de l'estudi, així com el consum calòric total, expressat en Kcal (C). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=11-12 rates/grup). \*\*\*p<0.001 i \*\*p<0.01 vs control.

### 2.1.2. Pes corporal i de diferents teixits

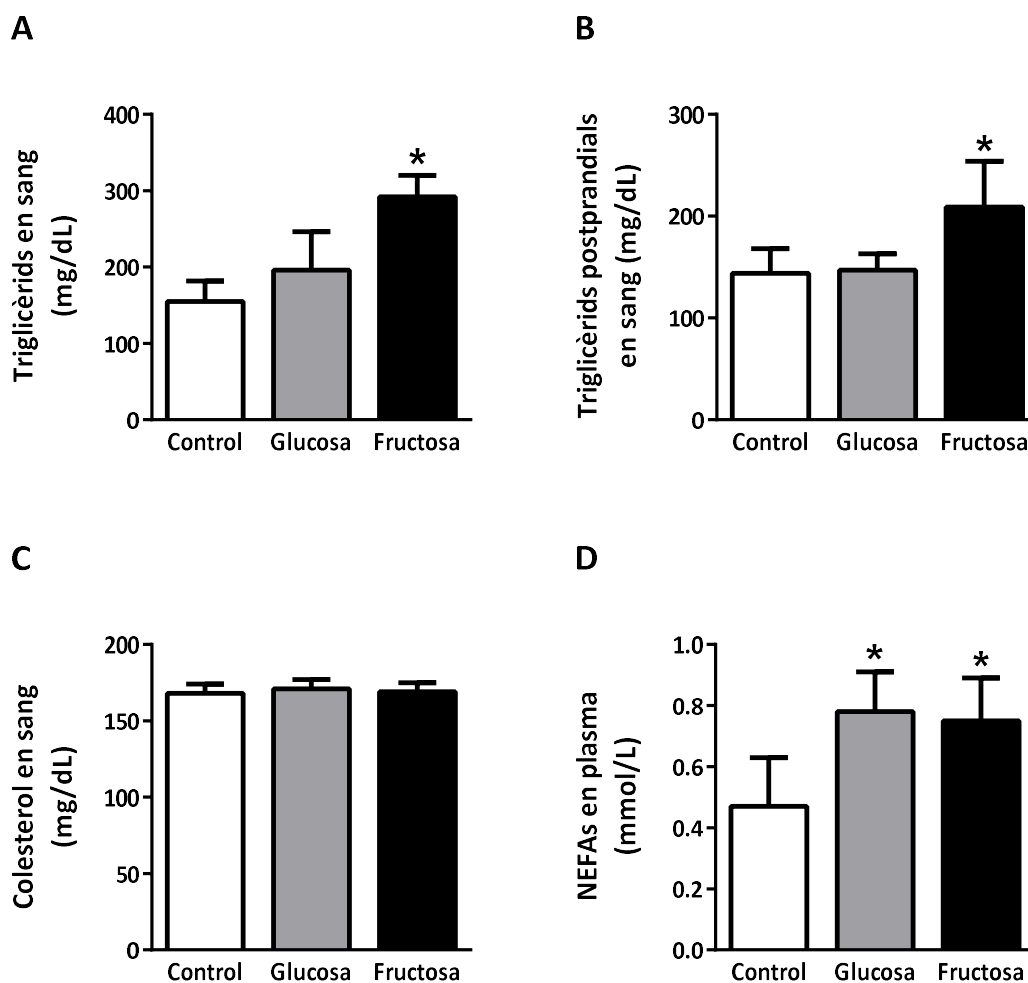
Pel que fa al pes corporal dels animals, s'observà que tant el pes final, com l'AUC del pes al llarg de l'estudi es van incrementar significativament només en el grup fructosa respecte el control (Figura V-23A-B). De la mateixa manera, el pes del teixit adipós respecte la longitud del fèmur va ser superior només en el grup fructosa. En canvi, tant en el grup glucosa com en el fructosa es va produir un increment en el pes relatiu del fetge (Figura V-23C). No obstant, cal esmentar que l'increment en el grup fructosa va ser significativament superior respecte el grup glucosa.



**Figura V-23.** Pes corporal (A), AUC del pes corporal durant les 28 setmanes (B) i pes del fetge i del teixit adipós, relatiu a la longitud del fèmur (C) al final de l'estudi. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control i #p<0.05 vs glucosa.

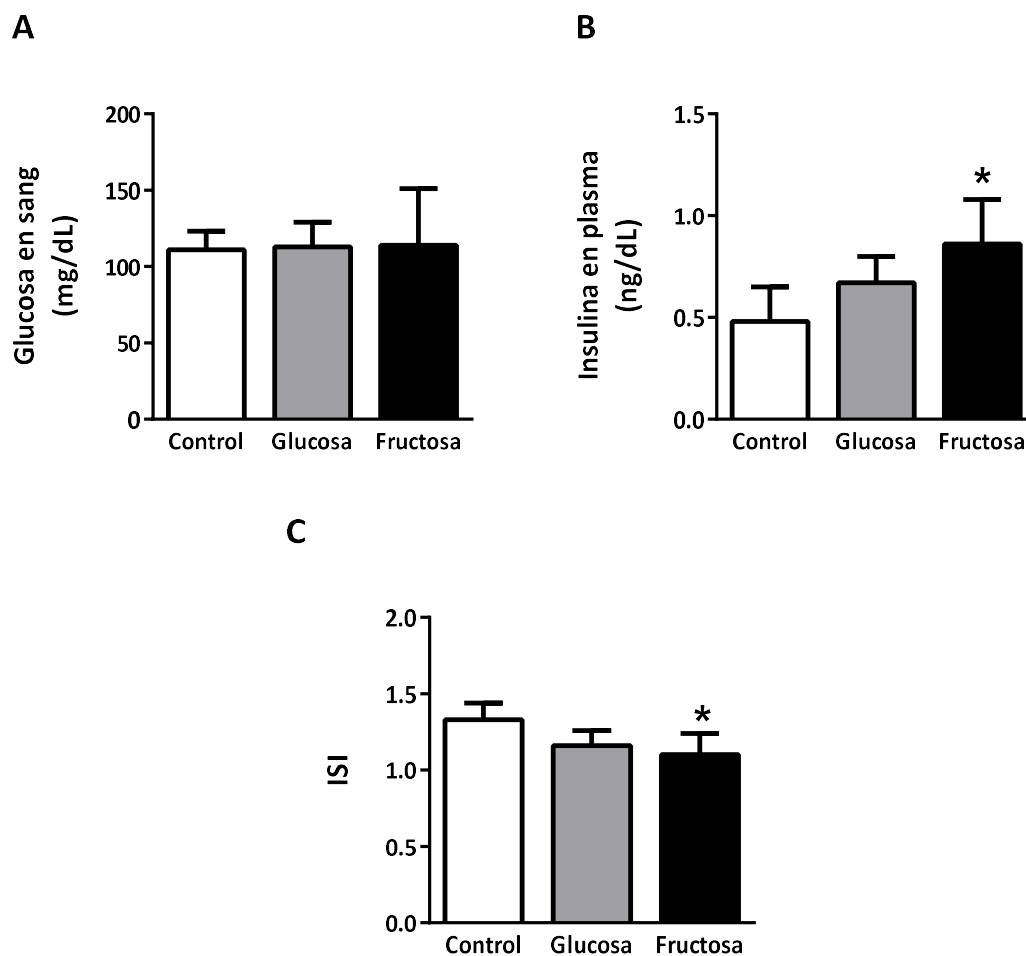
## 2.2. Anàlisi de paràmetres en sang i plasma

Quant a l'anàlisi de lípids, la determinació de triglicèrids en sang va mostrar que només la suplementació amb fructosa produïa un increment dels nivells de triglicèrids tant en dejú (12 h de dejú) com en un estat que es pot considerar postprandial (2 h de dejú), respecte el grup control i el grup glucosa (Figura V-24A-B). En canvi, no s'observaren diferències en els nivells de colesterol (Figura V-24C) entre els grups, però sí un increment de la concentració de NEFAs en plasma en els dos grups suplementats amb sucre (Figura V-24D).



**Figura V-24.** Nivells de triglicèrids en dejú (A) i postprandials (B) en sang, així com de colesterol (C) i NEFAs (D) en plasma al final de l'estudi. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

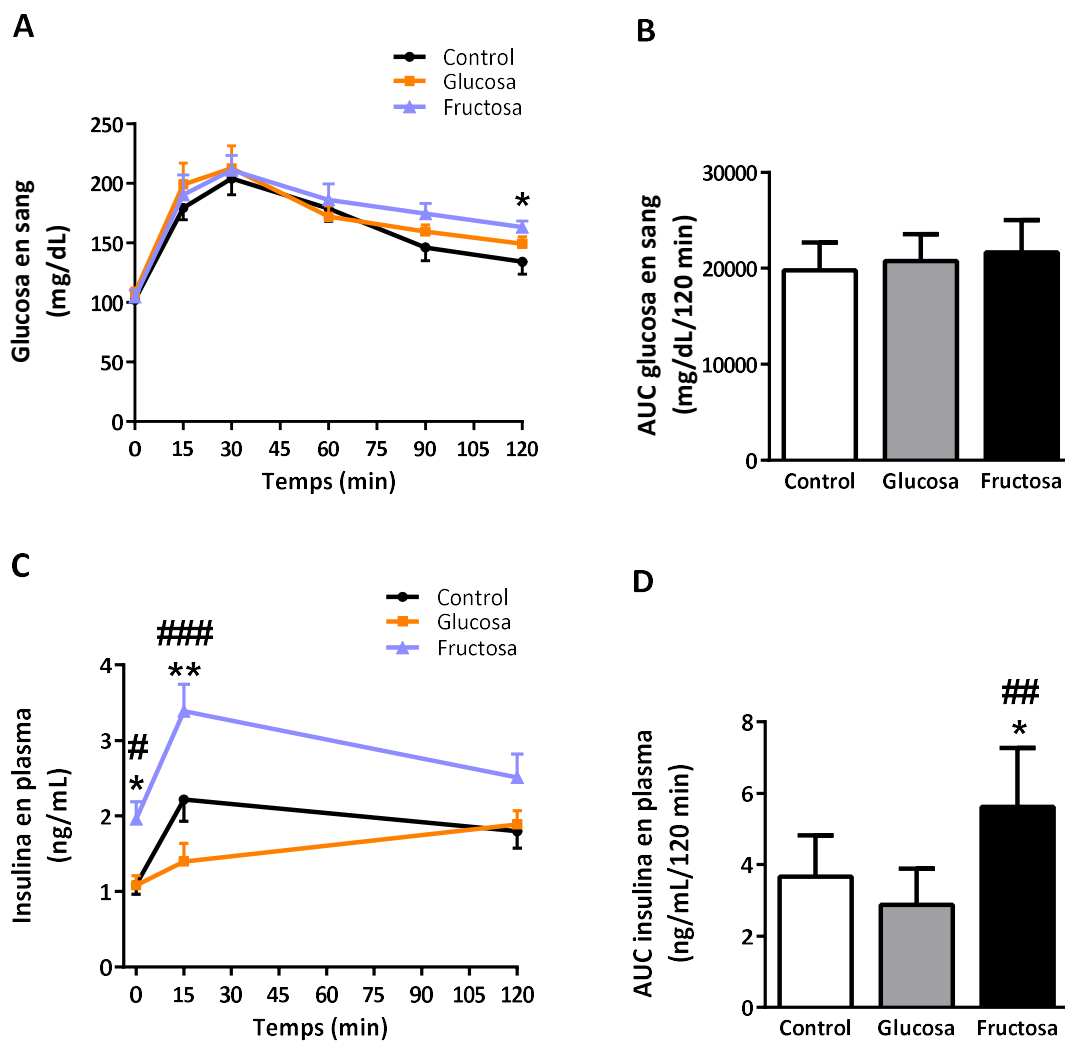
Els nivells de glucosa no es van modificar en els grups suplementats amb sucres (Figura V-25A) però, en canvi, sí que s'observà hiperinsulinèmia en el grup fructosa (Figura V-25B). Així, de la mateixa manera que en l'estudi anterior, es calculà l'ISI. En aquest cas, s'obtingué que només la fructosa reduïa significativament la sensibilitat a la insulina respecte el grup control (Figura V-25C).



**Figura V-25.** Nivells de glucosa en sang (A) i d'insulina en plasma (B), així com valors de l'índex ISI (C) al final de l'estudi. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

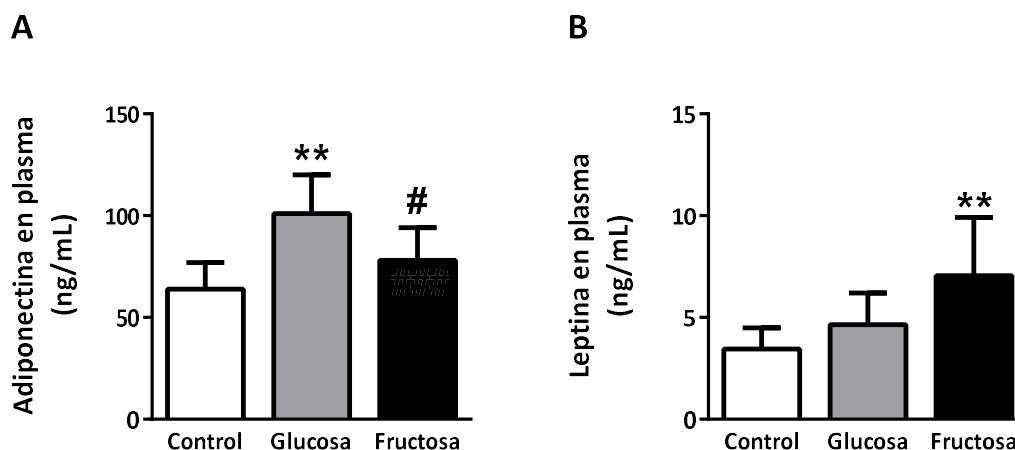
Abans de finalitzar l'estudi, per tal de valorar la tolerància a la glucosa es va realitzar el GTT. Tot i que la corba va presentar una tendència similar en tots els grups, al final del test, als 120 min després de l'administració de glucosa, el grup fructosa va mostrar un increment de la concentració de glucosa respecte el grup control (Figura V-26A). No obstant, en realitzar el càlcul de l'AUC de la concentració de glucosa no s'obtingueren diferències entre els grups (Figura V-26B).

A més, en aquest mateix test, es van determinar els nivells d'insulina plasmàtica a l'inici i als 15 i 120 min després de l'administració de glucosa. S'observà que els animals del grup fructosa presentaven un increment de la concentració d'insulina en els dos primers temps respecte el grup control i el grup glucosa (Figura V-26C). Així mateix, l'AUC de la concentració d'insulina va mostrar un increment significatiu en el grup fructosa respecte els altres dos grups (Figura V-26D).



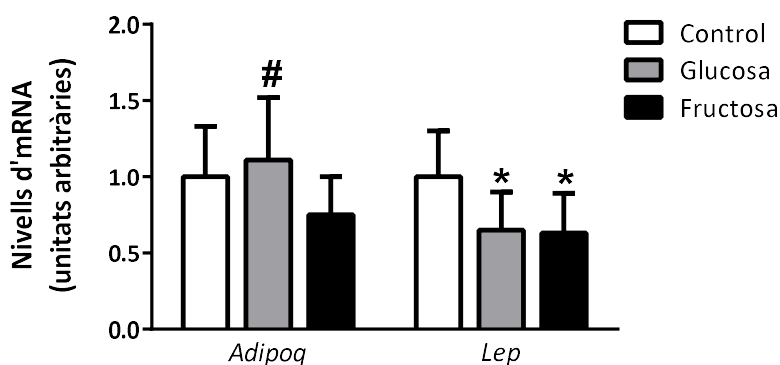
**Figura V-26.** Concentracions de glucosa a diferents temps durant el TTG (A) i AUC de les mateixes (B), així com concentracions d'insulina plasmàtica (C) i AUC de les mateixes (D). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=11-12 rates/grup). \* $p < 0.05$  i \*\* $p < 0.01$  vs control i # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  i ### $p < 0.001$  vs glucosa.

Per altra banda, també es va analitzar la concentració d'adiponectina i leptina, hormones importants per la regulació del metabolisme glucídic i lipídic. S'observà que la suplementació amb glucosa produí una hiperadiponectinèmia respecte el grup control i el grup fructosa (Figura V-27A), mentre que els nivells de leptina van incrementar-se significativament només en el grup fructosa (Figura V-27B).



**Figura V-27.** Concentració plasmàtica d'adiponectina (A) i leptina (B) al final de l'estudi. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*\*p<0.01 vs control i #p<0.05 vs glucosa.

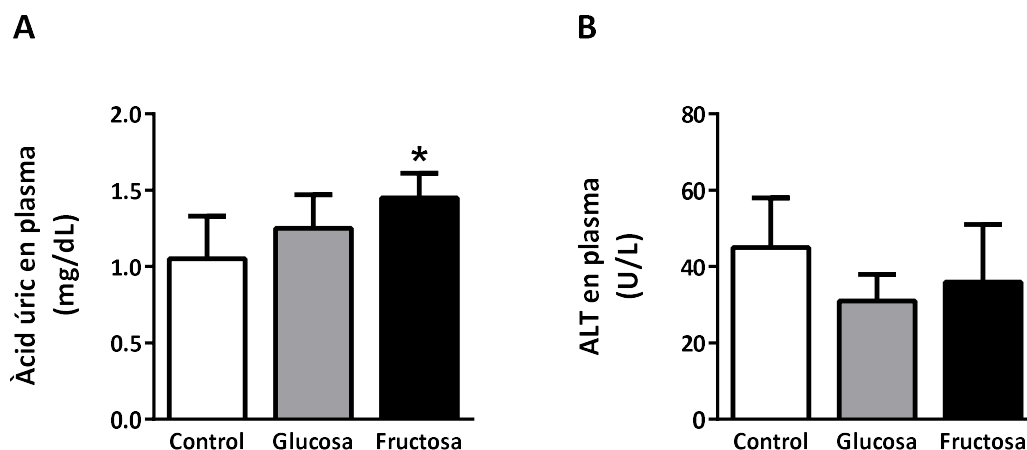
A més, es va analitzar l'expressió gènica d'aquestes hormones en el teixit adipós, on són sintetitzades. S'observà un increment dels nivells d'*Adipoq* en el grup glucosa, però les diferències només resultaren ser significatives comparades amb el grup fructosa. Pel que fa a la leptina, s'obtingué una disminució dels nivells d'mRNA tant en el grup glucosa com en el fructosa (Figura V-28).



**Figura V-28.** Nivells d'mRNA d'*Adipoq* i *Lep* en el teixit adipós. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control i #p<0.05 vs glucosa.

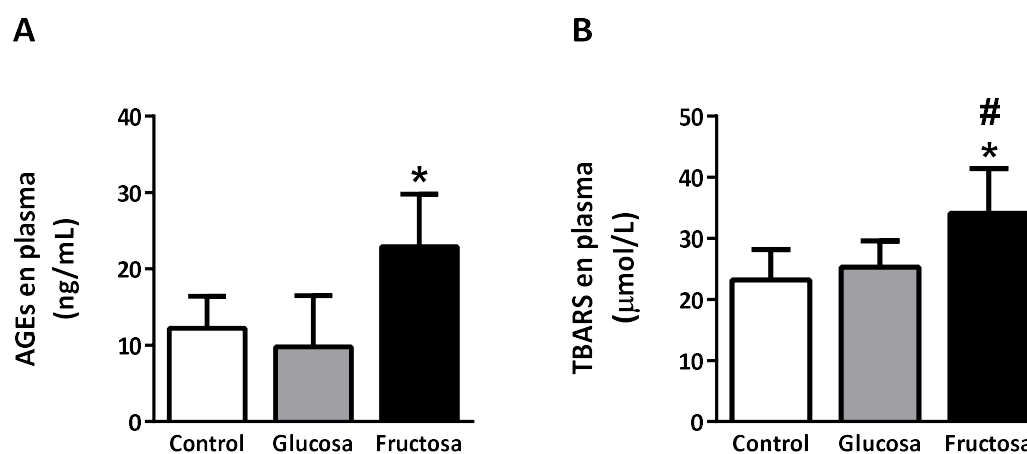
Per altra banda, es va determinar la concentració d'àcid úric, producte associat al metabolisme de la fructosa, així com els nivells de la transaminasa ALT. Pel que fa a l'àcid úric, s'obtingué un increment únicament en el grup fructosa (Figura V-29A). En canvi, no s'observaren diferències entre la concentració d'ALT entre els grups en estudi (Figura V-29B).





**Figura V-29.** Concentració plasmàtica d'àcid úric (A) i ALT (B) al final de l'estudi. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

Finalment, també es va valorar la concentració d'AGEs i TBARS, relacionats amb la glicació de proteïnes i la peroxidació lipídica, respectivament. En ambdós casos, s'obtingué que només la ingesta de fructosa produïa un increment dels seus nivells (Figura V-30) en plasma.



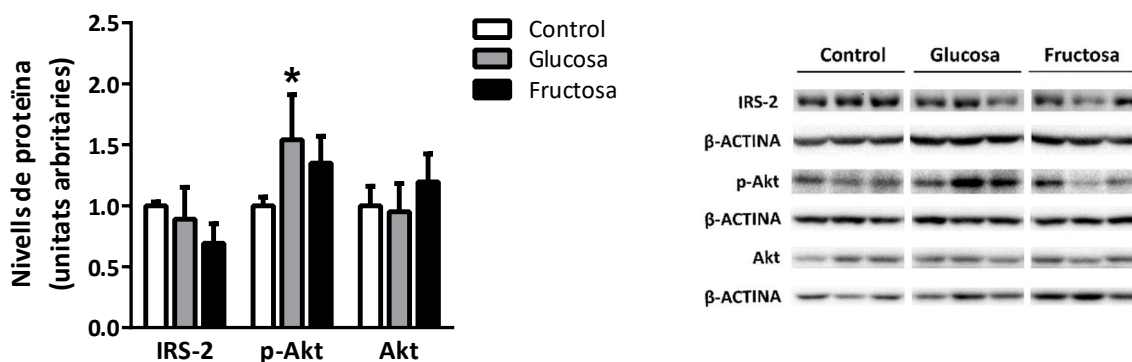
**Figura V-30.** Concentració plasmàtica d'AGEs (A) i TBARS (B) al final de l'estudi. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control i #p<0.05 vs glucosa.

### 2.3. Efectes en la via de senyalització de la insulina en el fetge

Per tal d'esbrinar si la disminució de la sensibilitat a la insulina era causada per un dèficit de senyalització a nivell hepàtic, es va determinar l'expressió de diferents proteïnes que participen en la cascada de senyalització de la insulina, concretament en la via PI3K/Akt.

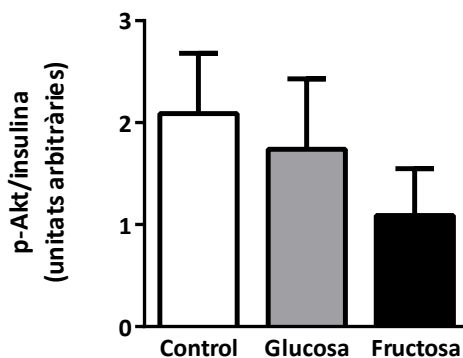
En primer lloc, s'analitzà l'expressió d'IRS-2 i la forma fosforilada i total de la proteïna Akt. No s'obtingueren diferències pel que fa a l'expressió d'IRS-2 ni en la forma total d'Akt. En canvi, s'observà un increment significatiu de p-Akt en el grup glucosa (Figura V-31).

A



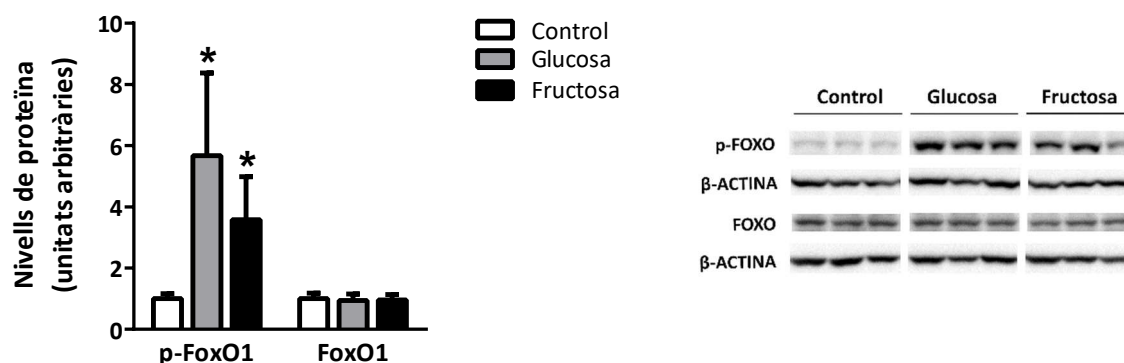
**Figura V-31.** Nivells de les proteïnes IRS-2, p-Akt (Ser<sup>473</sup>) i Akt en teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

Així mateix, es va determinar l'activació de la proteïna Akt en funció dels nivells d'insulina, mitjançant el càlcul p-Akt/[insulina plasmàtica]. Tot i que s'observà una important disminució en el grup fructosa, les diferències no van ser significativament estadístiques (Figura V-31).



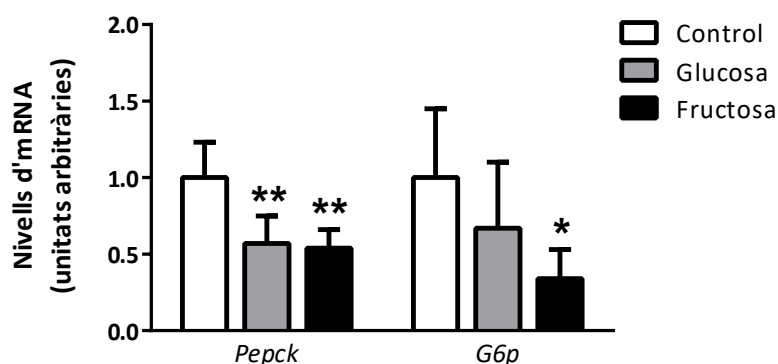
**Figura V-32.** Nivells de p-Akt (Ser<sup>473</sup>) en funció de la concentració d'insulina plasmàtica. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD (n=4-5 rates/grup).

Seguidament, es va analitzar l'activació del factor de transcripció FoxO1. La insulina, a través de la fosforilació d'Akt, promou la inactivació de FoxO1, ja que indueix la seva fosforilació en la posició Ser<sup>256</sup>. Tant el grup glucosa com fructosa van presentar un important increment de p-FoxO1 (Ser<sup>256</sup>) respecte el control, mentre que la forma total no va mostrar diferències entre els grups (Figura V-33).

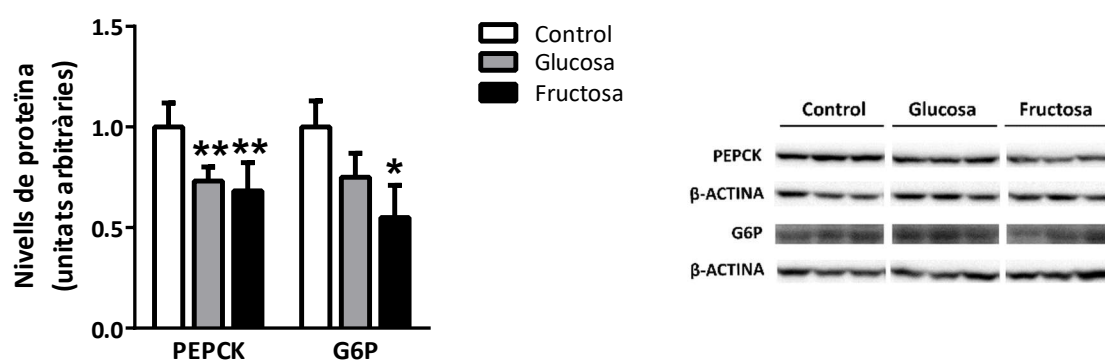


**Figura V-33.** Nivells de p-FoxO1 (Ser<sup>256</sup>) i FoxO1 en el fetge. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

A continuació, es va analitzar l'expressió gènica i proteica de PEPCK i G6P, principals enzims implicats en la gluconeogènesi i diana de FoxO1. S'observà una reducció dels dos enzims tant pel que fa als nivells d'mRNA (Figura V-34) com de proteïna (Figura V-35) en els animals dels dos grups suplementats amb sucre. No obstant, en el cas de G6P la reducció en el grup glucosa no va ser significativa.

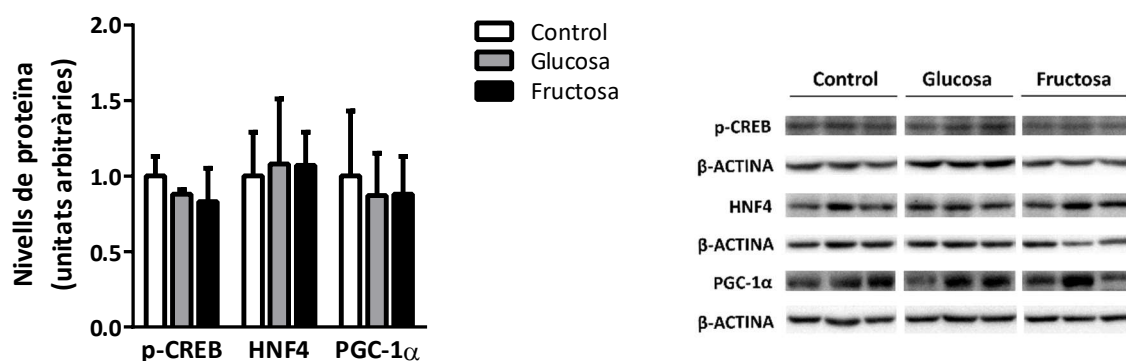


**Figura V-34.** Nivells d'mRNA de *Pepck* i *G6p* en teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs control.



**Figura V-35.** Nivells de les proteïnes PEPCK i G6P en teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs control.

Així mateix, es va determinar l'expressió d'altres proteïnes involucrades en la regulació de la gluconeogènesi com són p-CREB (Ser<sup>133</sup>), HNF4 i PGC-1 $\alpha$ . No obstant, cap d'elles va mostrar diferències entre els grups d'estudi (Figura V-36).

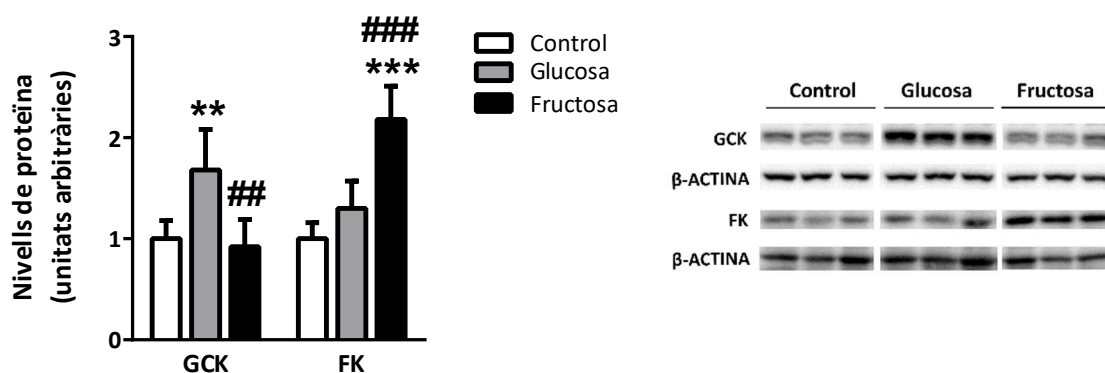


**Figura V-36.** Nivells de les proteïnes p-CREB (Ser<sup>133</sup>) i HNF4 i PGC-1 $\alpha$  d'extractes hepàtics de proteïna totals i nuclear respectivament. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup).

## 2.4. Efectes en el metabolisme de carbohidrats i lípids

### 2.4.1. Metabolisme de la glucosa i la fructosa

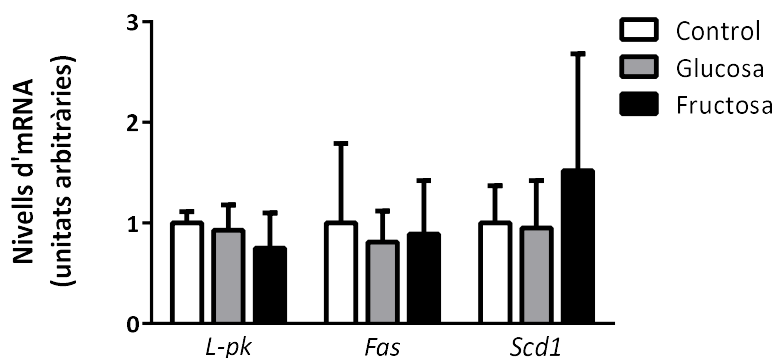
La GCK i la FK són els primers enzims que metabolitzen la glucosa i la fructosa respectivament, una vegada són captades pel fetge. S'observà que els nivells de GCK s'incrementaven en el grup glucosa, mentre que els nivells de FK augmentaren en el grup fructosa respecte els altres grups (Figura V-37).



**Figura V-37.** Nivells de les proteïnes GCK i FK en teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs control i ##p<0.01, ###p<0.001 vs glucosa.

### 2.4.2. Lipogènesi

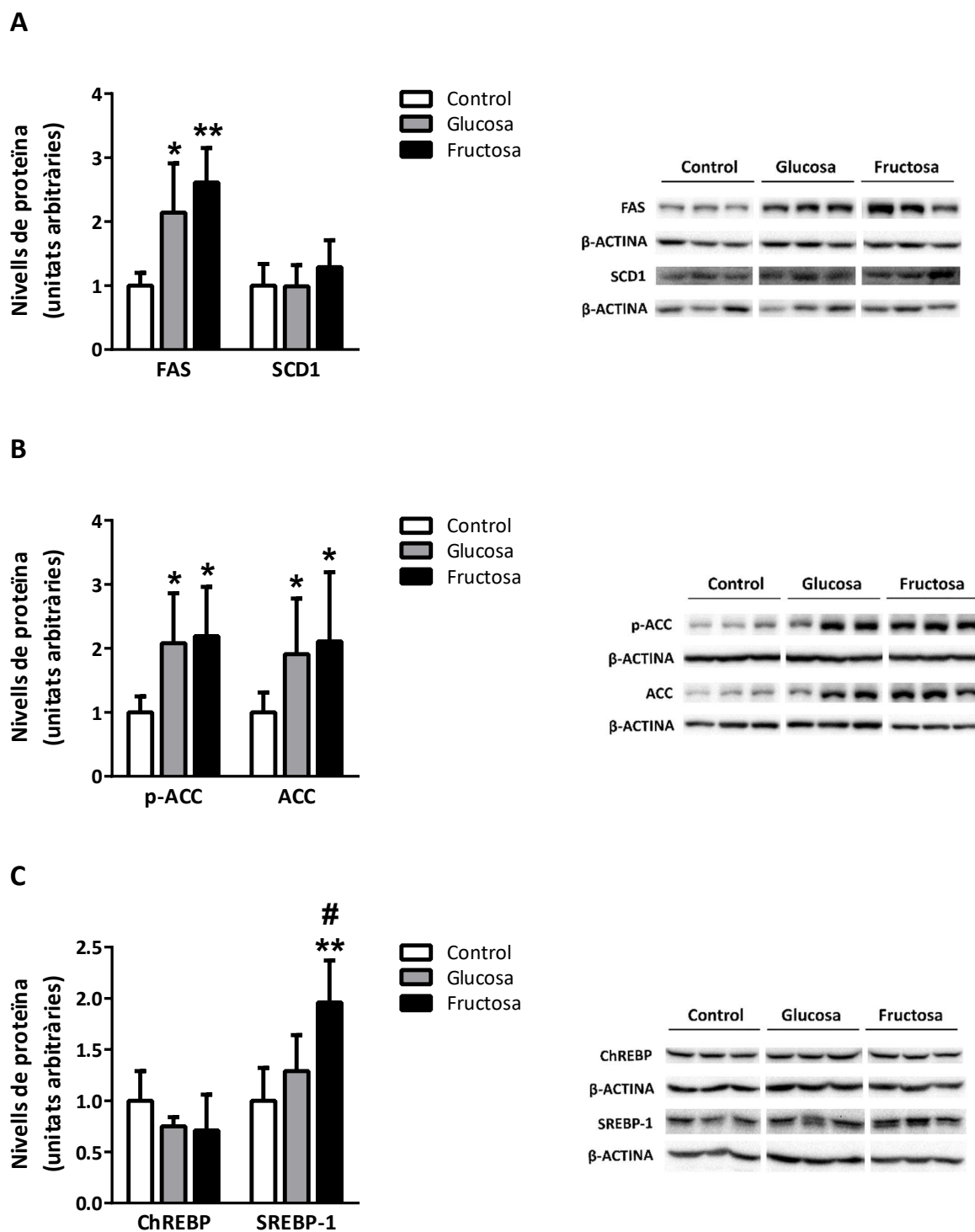
De manera similar a l'estudi 1, es va determinar l'expressió hepàtica de diferents enzims implicats en la lipogènesi. Pel que fa a l'expressió gènica, es van analitzar els nivells d'mRNA d'L-PK, FAS i SCD1. No obstant, cap dels enzims va mostrar diferències entre els tres grups d'estudi (Figura V-37).



**Figura V-38.** Nivells d'mRNA d'*L-pk*, *Fas* i *Scd1* en teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup).

Pel que fa a l'expressió proteica, en el cas d'SCD1 els nivells tampoc es van modificar entre els grups, però en canvi la proteïna FAS va mostrar un increment de 2.14 i 2.61 en els grups glucosa i fructosa, respectivament, comparat amb al grup control (Figura V-39A). També es va quantificar l'expressió proteica de la forma fosforilada (Ser<sup>79</sup>) i la forma total d'ACC. Ambdues formes van presentar un increment en els dos grups suplementats amb sucre, suggerint així que el grau d'activació d'aquest enzim no es va modificar (Figura V-39B).

Per altra banda, es va determinar l'expressió proteica dels factors de transcripció ChREBP i SREBP-1, reguladors principals dels enzims lipogènics. Els nivells de ChREBP no es van veure modificats en els grups suplementats amb sucre, però en canvi sí que s'observà un increment de l'expressió proteica d'SREBP-1 en els animals suplementats amb fructosa en l'aigua de beguda (Figura V-39C).

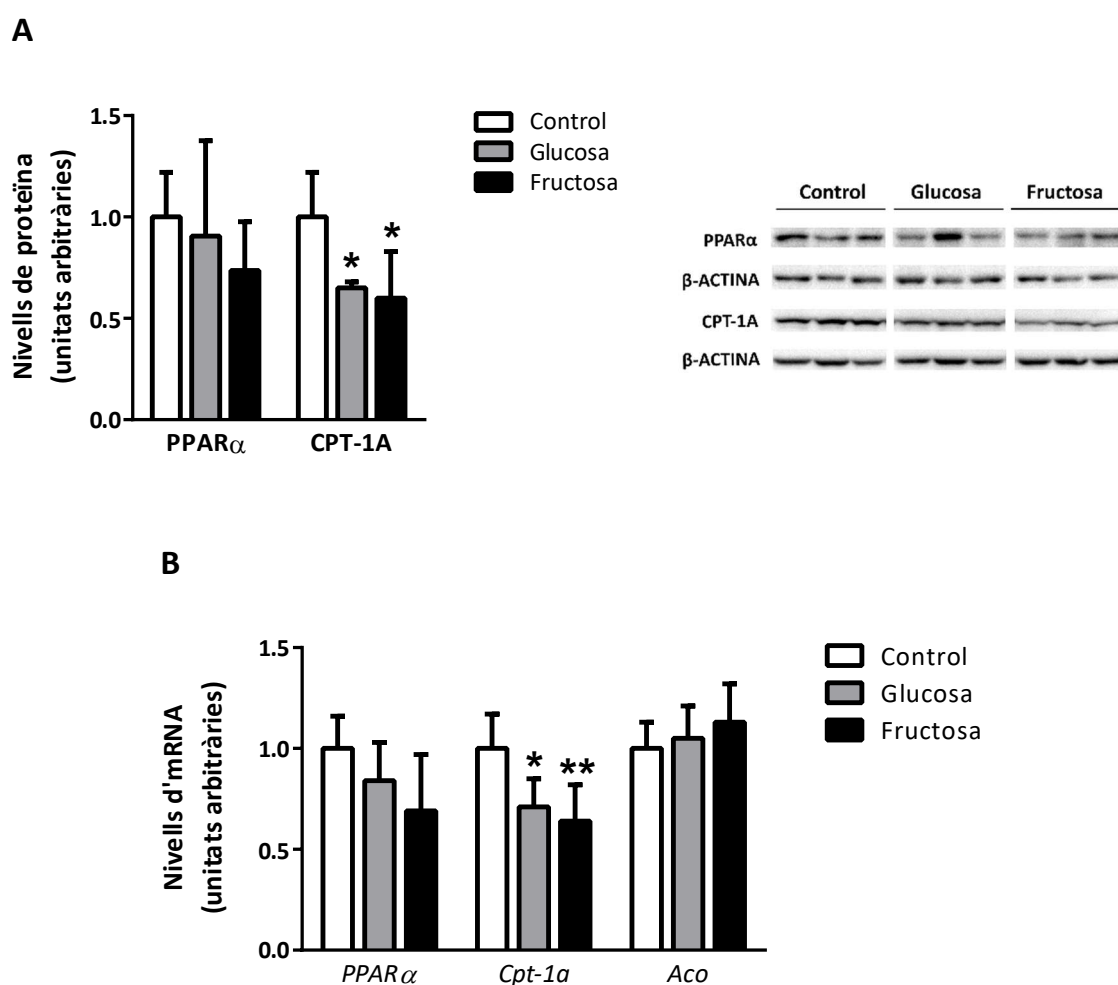


**Figura V-39.** Nivells de les proteïnes FAS i SCD1 (A), p-ACC (Ser<sup>79</sup>) i ACC (B) en extractes hepàtics de proteïna total així com SREBP-1 i ChREBP (C) en extractes hepàtics nuclears. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05 i \*\*p<0.01 vs control i #p<0.05 vs glucosa.

### 2.4.3. $\beta$ -oxidació

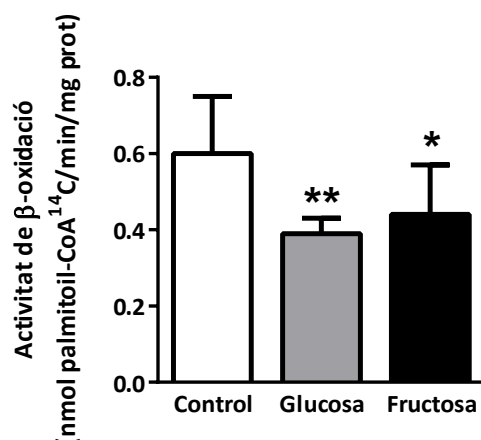
Respecte el catabolisme lipídic, es va determinar l'expressió proteica i gènica del factor de transcripció PPAR $\alpha$ , principal regulador de la  $\beta$ -oxidació. Tot i que no s'obtingueren diferències significatives entre els grups en estudi, s'observà una tendència a la reducció de l'expressió de PPAR $\alpha$  en el grup fructosa (Figura V-40A).

També es van analitzar els nivells de CPT-1A, gen diana de PPAR $\alpha$  i enzim clau en la  $\beta$ -oxidació mitocondrial. Els resultats van mostrar una reducció de l'expressió gènica i proteica de CPT-1A en els grups suplementats amb sucre en l'aigua de beguda (Figura V-40). En canvi, els nivells d'mRNA d'ACO, enzim clau en la  $\beta$ -oxidació peroxisòmica, no es van veure modificats per la seva ingesta (Figura V-40B).



**Figura V-40.** Nivells de les proteïnes PPAR $\alpha$  i CPT-1A (A) així com nivells d'mRNA de PPAR $\alpha$ , Cpt-1A i Aco (B) en teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup per l'expressió gènica i n=4-5 rates/grup per l'expressió proteica). \*p<0.05 i \*\*p<0.01 vs control.

Finalment, es va determinar l'activitat de la  $\beta$ -oxidació hepàtica, la qual resultà reduïda significativament en els grups glucosa i fructosa (Figura V-41).

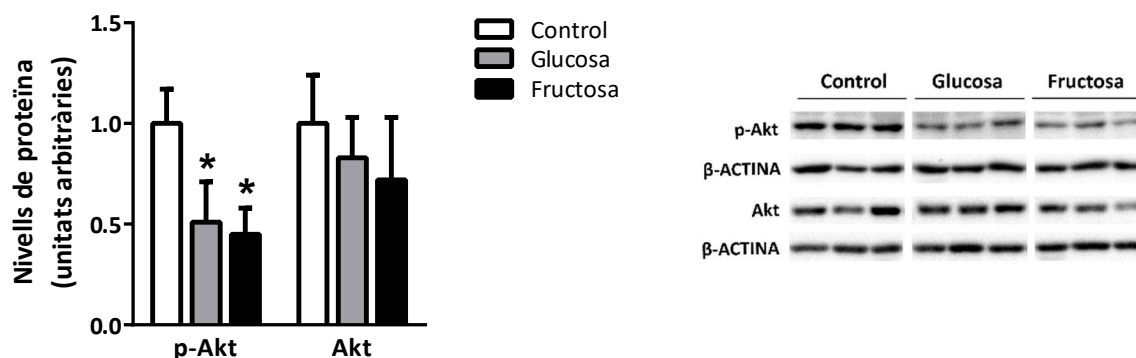


**Figura V-41.** Activitat de la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos hepàtica. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=6 rates/grup). \*p<0.05 i \*\*p<0.01 vs control.

#### 2.4.4. Lipòlisi

El teixit adipós és el principal reservori d'àcids grassos en forma de triglicèrids, els quals són hidrolitzats a través del procés de la lipòlisi en períodes d'alta demanda energètica. La insulina, per la seva banda, inhibeix el procés de la lipòlisi afavorint l'emmagatzematge de triglicèrids en el teixit adipós.

Així, considerant que es va observar una disminució de la sensibilitat a la insulina a nivell sistèmic, es van analitzar els nivells de p-Akt i Akt en el teixit adipós. S'obtingué que els dos grups suplementats amb sucre presentaven una disminució de la fosforilació d'Akt (Ser<sup>473</sup>), mentre que la forma total no es va veure modificada (Figura V-42). Així doncs, el teixit adipós en els animals del grup glucosa i fructosa presentava un dèficit de senyalització de la insulina.

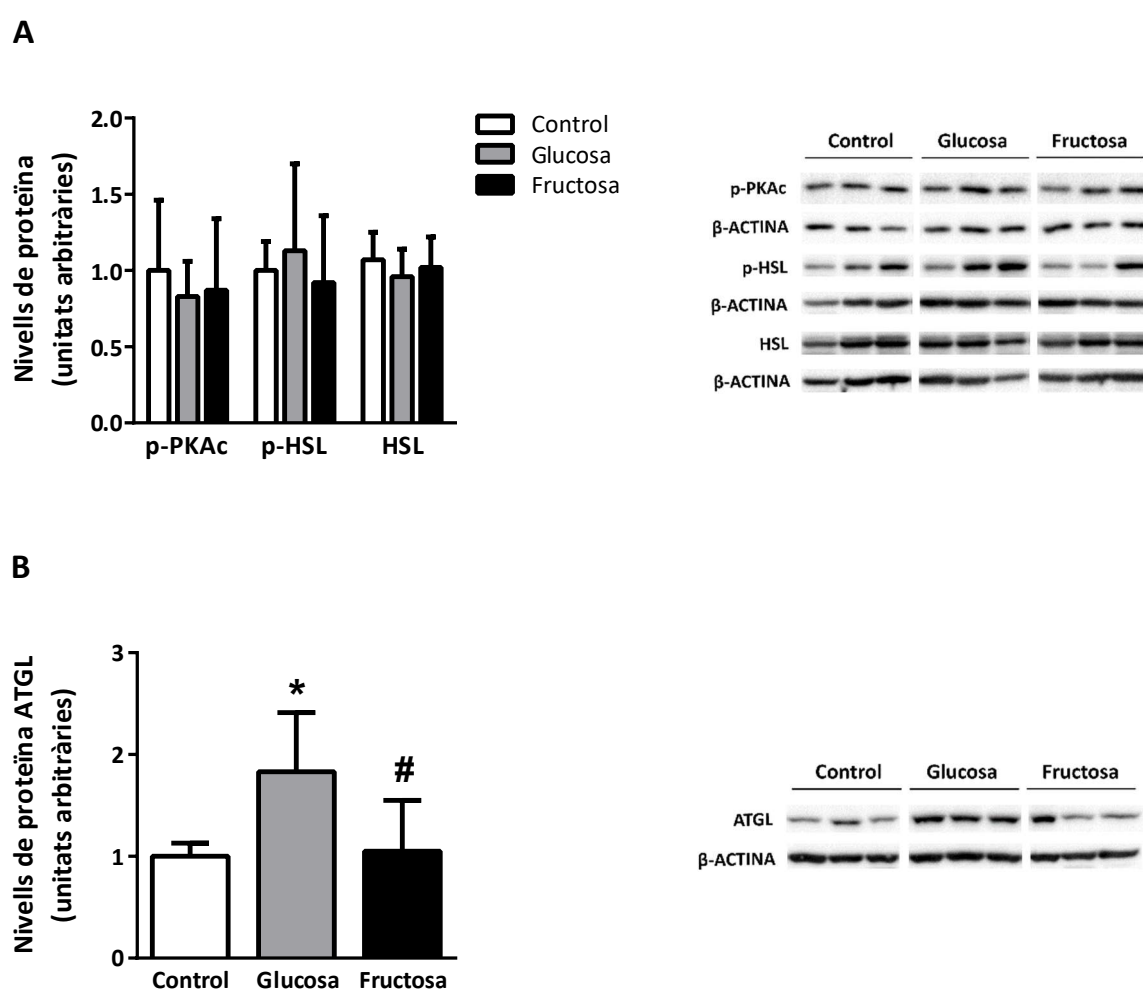


**Figura V-42.** Nivells de les proteïnes p-Akt (Ser<sup>473</sup>) i Akt en el teixit adipós. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

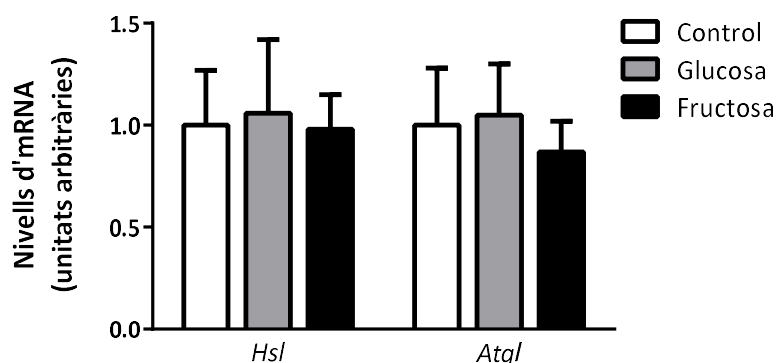


Amb aquests resultats, i tenint en compte que la concentració plasmàtica de NEFAs estava incrementada en el grup glucosa i fructosa, era d'esperar que la lipòlisi estigués activada en els dos grups suplementats amb sucres.

No obstant, en valorar l'expressió proteica de la lipasa HSL en la forma fosforilada i total així com de PKAc-p (Thr<sup>197</sup>), que promou la seva fosforilació, no es van observar diferències entre els grups (Figura V-43A). En canvi, la determinació de l'expressió proteica d'ATGL, una altra lipasa important en la degradació de triglicèrids, va mostrar un increment només en el grup glucosa respecte els grups control i fructosa (Figura V-43B). A més, l'anàlisi dels nivells d'mRNA dels gens *Atgl* i *Hsl* no va mostrar diferències entre els grups en estudi (Figura V-44).



**Figura V-43.** Nivells de les proteïnes p-PKAc (Thr<sup>197</sup>, p-HSL (Ser<sup>660</sup>) i HSL (A) així com ATGL (B) en el teixit adipós. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05 vs control i #p<0.05 vs glucosa.



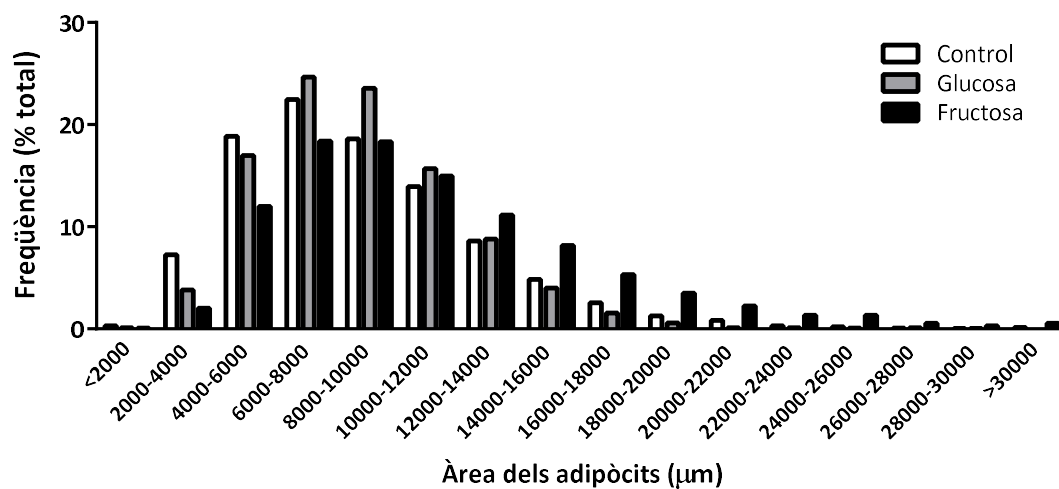
**Figura V-44.** Nivells d'mRNA d'*Hsl* i *Atgl* en el teixit adipós. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup).

#### 2.4.5. Emmagatzematge de lípids

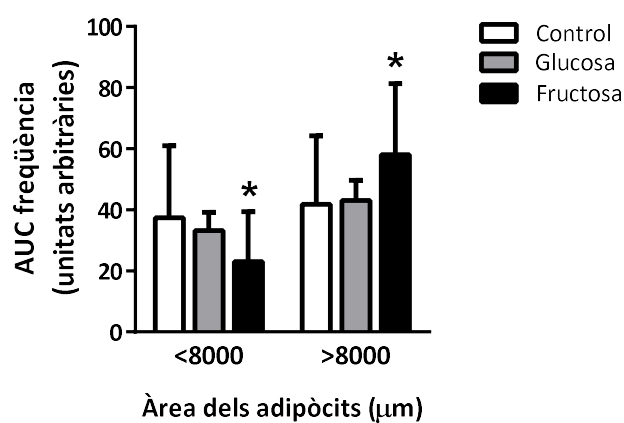
Considerant que tant la ingesta de glucosa com de fructosa produïa un increment de la lipogènesi hepàtica i una reducció de la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos, es va voler determinar si es produïen canvis morfològics en el teixit adipós, principal reservori de triglicèrids, o bé també hi havia una deposició ectòpica d'aquests lípids en altres teixits com el fetge o el múscul.

En primer lloc, es va analitzar el teixit adipós mitjançant la tinció de talls histològics amb H/E, a partir dels quals es va realitzar la quantificació de l'àrea dels adipòcits i, posteriorment, el càlcul de les freqüències de les diferents mides. S'observà que el grup fructosa presentava una menor proporció dels adipòcits més petits i un major percentatge dels més grans comparats amb els altres dos grups (Figura V-45A). Per l'anàlisi estadística d'aquestes dades es realitzà una taula de contingència amb els valors de l'AUC de la freqüència dels adipòcits amb mida inferior i superior a  $8000 \mu\text{m}^2$  que mostrà diferències significatives entre el grup fructosa i el control (Figura V-45B). Així, tal i com es mostra en les imatges representatives, la ingesta de fructosa va induir una hipertròfia dels adipòcits (Figura V-45C). D'aquesta manera, aquests resultats concorden amb l'increment del pes del teixit adipós observat només en el grup fructosa.

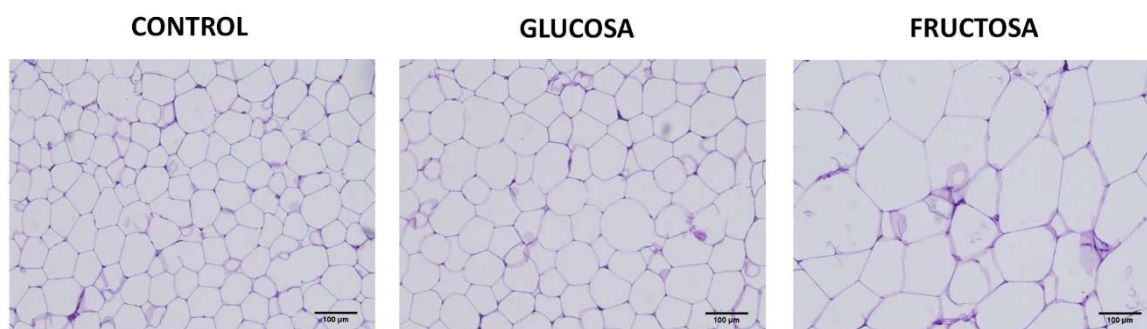
A



B

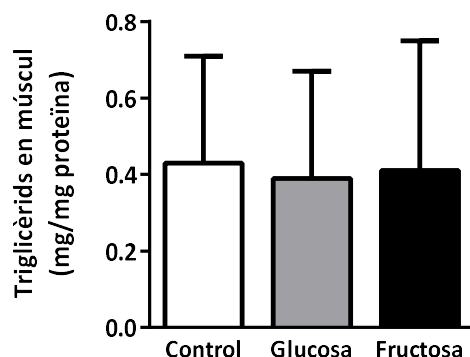


C



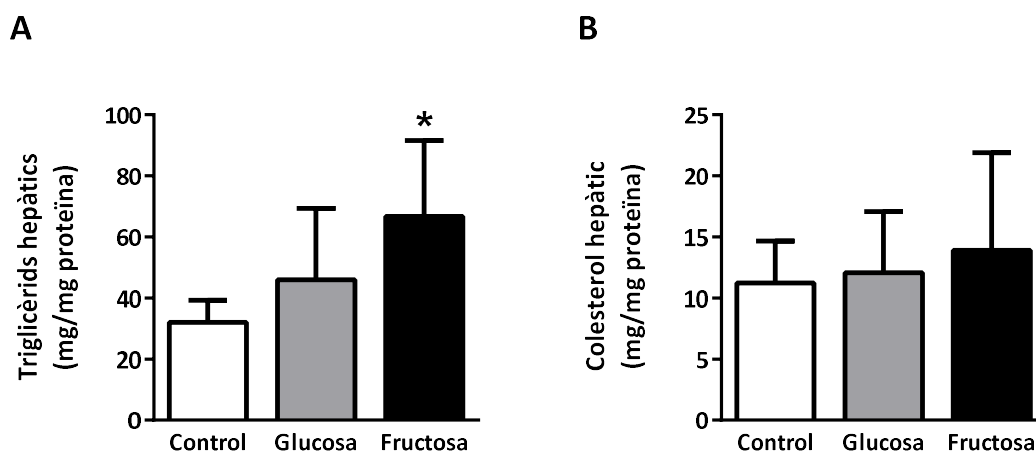
**Figura V-45.** Representació gràfica de la freqüència de la mida dels adipòcits (A), de l'AUC de la freqüència de la mida dels adipòcits inferior i superior a 8000 µm (B) i imatges representatives dels talls histològics de teixit adipós tenyits amb H/E. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=5 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

Per altra banda, es va quantificar el contingut de triglicèrids en el múscul, el qual no va presentar canvis en els grups suplementats amb sucres respecte el grup control (Figura V-46).



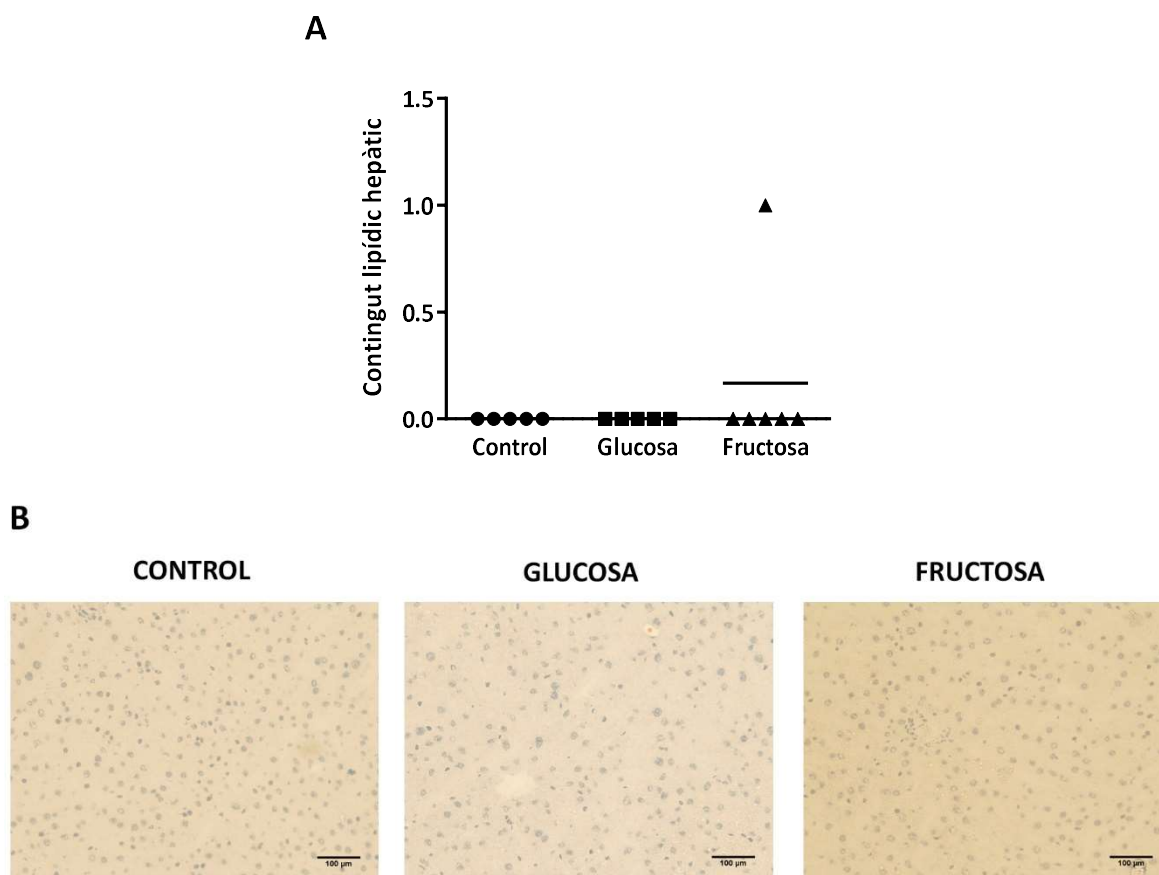
**Figura V-46.** Contingut de triglicèrids en múscul per mg de proteïna. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup).

També es va determinar el contingut hepàtic de triglicèrids i colesterol. S'observà que únicament la fructosa presentava un increment significatiu de 2 vegades en el contingut de triglicèrids respecte el control (Figura V-47A), mentre que no s'observaren diferències pel que fa al contingut de colesterol entre els grups d'estudi (Figura V-47B).



**Figura V-47.** Contingut de triglicèrids (A) i colesterol (B) hepàtics per mg de proteïna. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

No obstant, aquest increment de triglicèrids en el fetge no va resultar en una esteatosi hepàtica aparent a nivell histològic, ja que en l'anàlisi de talls histològics amb la tinció d'ORO no es va observar un increment de les inclusions lipídiques (Figura 48).

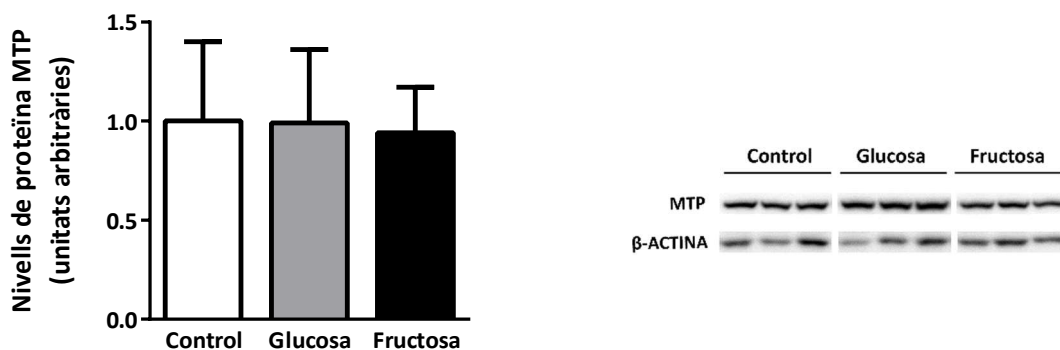


**Figura V-48.** Valoració del contingut lipídic hepàtic a partir dels talls histològics de fetge tenyits amb ORO (A) i imatges representatives dels talls histològics de fetge tenyits amb ORO (B). (n=5-6 rates/grup).

#### 2.4.6. Transport i captació de triglicèrids

L'increment de la lipogènesi hepàtica i l'absència d'una clara esteatosi en el fetge dels animals suplementats amb fructosa suggeria que els triglicèrids produïts eren secretats a la sang en forma de lipoproteïnes.

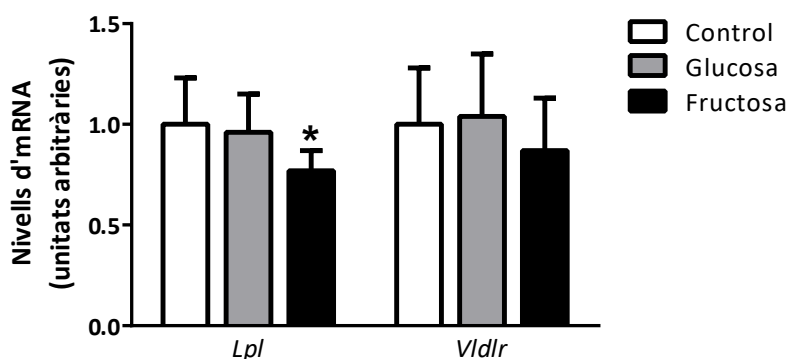
Per aquest motiu es va determinar l'expressió de la proteïna MTP. No obstant, a diferència de l'estudi 1, no es van observar diferències significatives entre els grups (Figura V-49).



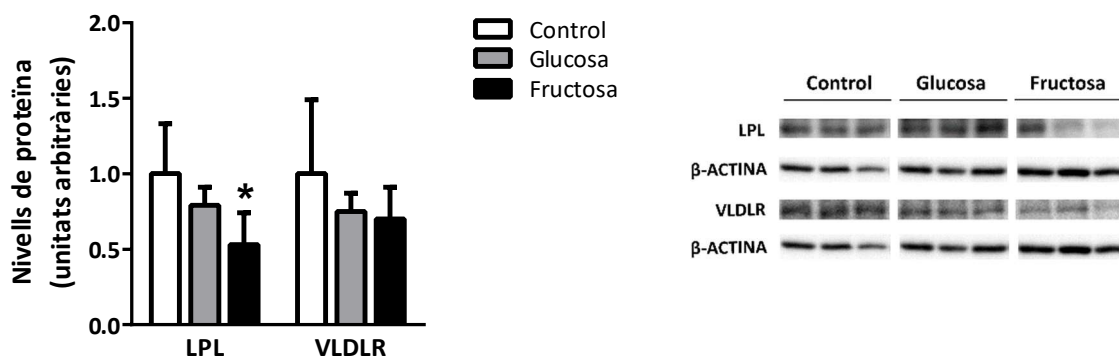
**Figura V-49.** Nivells de la proteïna MTP en teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup).

Un cop alliberades a la sang, les VLDL són principalment captades pel múscul i el teixit adipós. Per aquest motiu, es va realitzar l'anàlisi de proteïnes involucrades en la captació de VLDL en els dos teixits.

Pel que fa al teixit adipós, s'obtingué que tant l'expressió gènica com proteica de l'enzim LPL era menor en els animals del grup fructosa respecte el control. En quant els nivells de VLDLR, malgrat no van mostrar diferències significatives, sí que s'observà una disminució de l'expressió proteica en els dos grups suplementats amb sucre (Figura V-50-51).

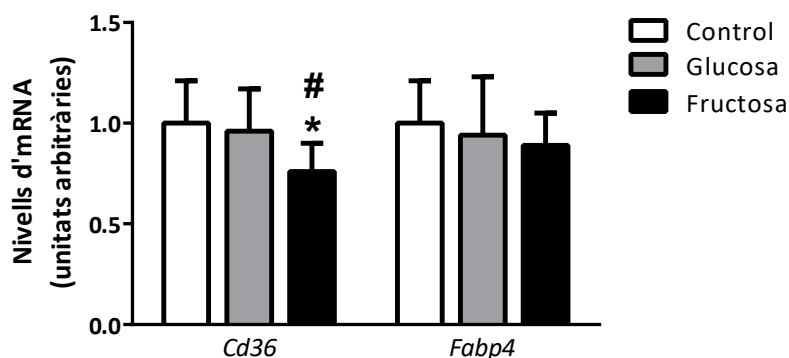


**Figura V-50.** Nivells d'mRNA d'*Lpl* i *Vldlr* en el teixit adipós. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control.



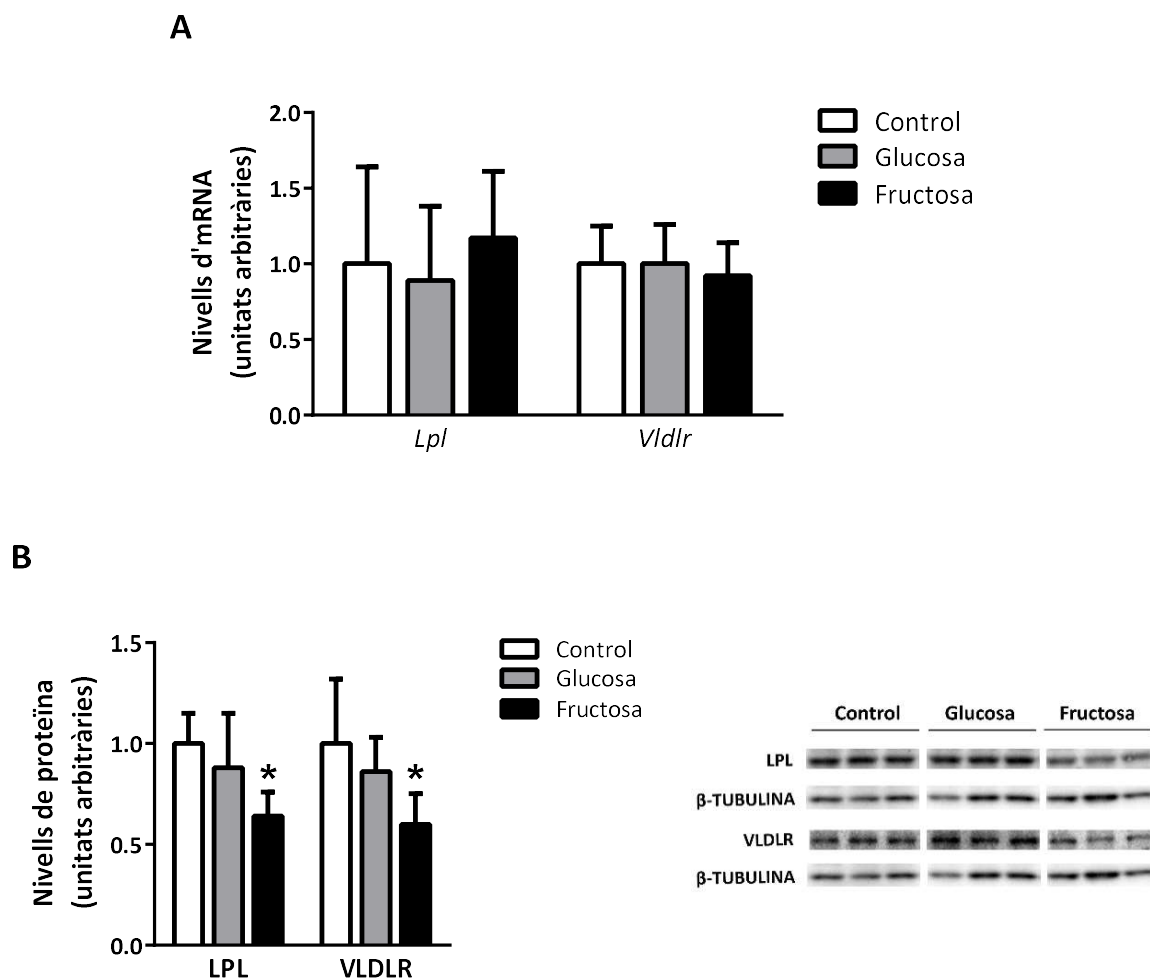
**Figura V-51.** Nivells de les proteïnes LPL i VLDLR en el teixit adipós. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

També, es van determinar els nivells d'mRNA de *Cd36* i *Fabp4*, que faciliten l'entrada d'àcids grassos a la cèl·lula. Els nivells de *Fabp4* no es van veure modificats, però sí que s'observà una reducció de l'expressió gènica de *Cd36* en el grup fructosa respecte els altres dos grups (Figura V-52).



**Figura V-52.** Nivells d'mRNA de *Cd36* i *Fabp4* en el teixit adipós. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup) \*p<0.05 vs control i #p<0.05 vs glucosa.

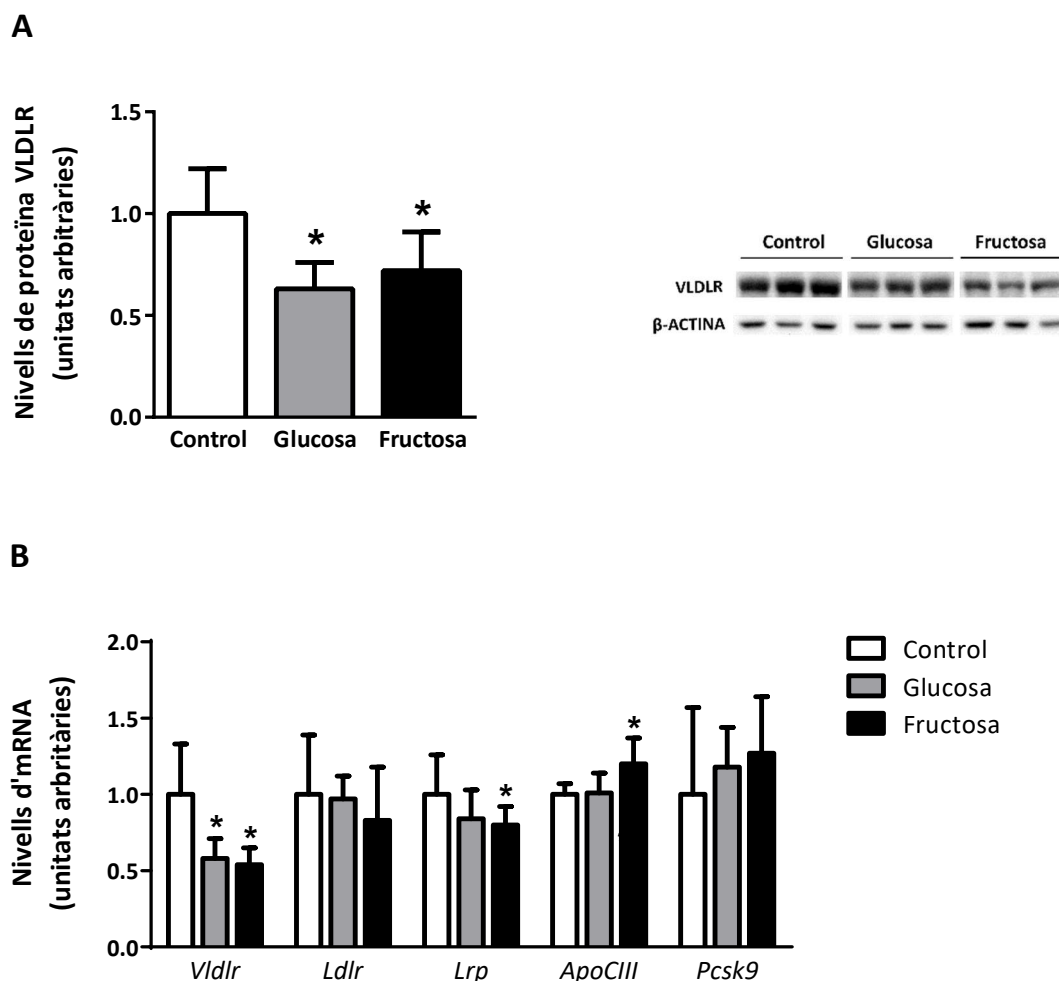
Respecte el múscul, tot i no observar-se canvis en l'expressió gènica d'LPL i VLDLR, sí que s'obtingué una disminució significativa de l'expressió d'ambdues proteïnes únicament en el grup fructosa (Figura V-53).



**Figura V-53.** Nivells d'mRNA d'*Lpl* i *Vldlr* (A) així com de les proteïnes LPL i VLDLR (B) en el múscul. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup per l'expressió gènica i n=4-5 rates/grup per l'expressió proteica). \*p<0.05 vs control.

Per altra banda, també es va estudiar el procés d'aclariment hepàtic de lipoproteïnes residuals, analitzant l'expressió de VLDLR, LDLR i LRP. S'obtingué que els nivells d'mRNA d'*Lrp* només estaven disminuïts significativament en el grup fructosa, tot i que el grup glucosa també presentava una tendència a la reducció. Pel que fa a VLDLR, tant l'anàlisi de l'expressió gènica com proteica va mostrar una reducció dels seus nivells en els dos grups suplementats amb sucre a la beguda. A més, els nivells d'mRNA d'*ApoCIII*, apolipoproteïna que inhibeix l'activitat d'LPL, estaven incrementats en el grup fructosa. En canvi, no s'observaren modificacions en l'expressió de *Ldlr* ni *Pcsk9* (Figura V-54).





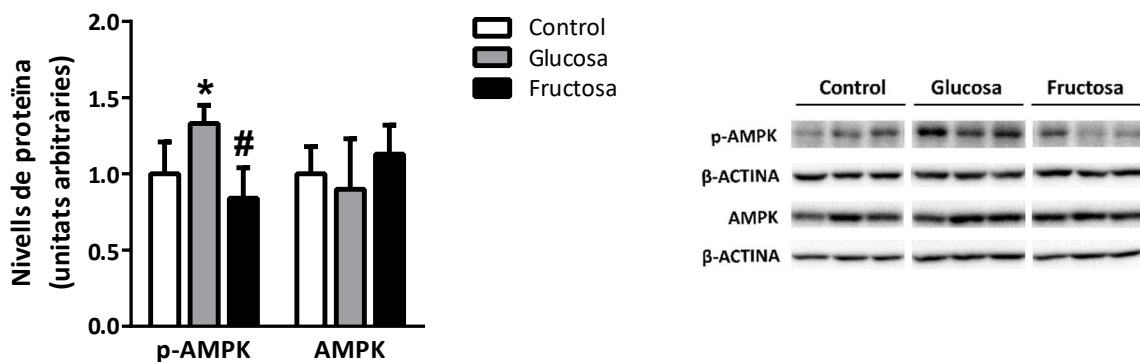
**Figura V-54.** Nivells de la proteïna VLDLR (A) així com d'mRNA de *Vldlr*, *Ldlr*, *Lrp*, *Apo C-III* i *Pcsk9* (B) en el teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup per l'expressió gènica i n=4-5 rates/grup per l'expressió proteica).

## 2.5. Efectes en nodes moleculars del control energètic

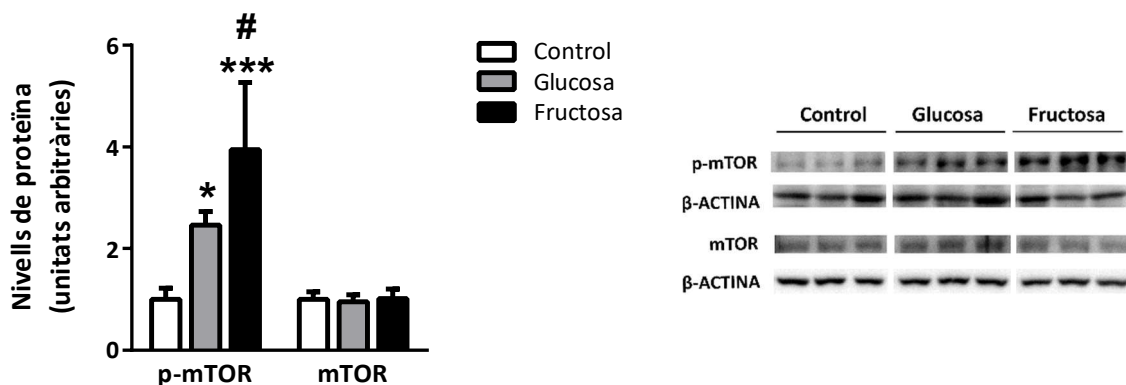
També es van valorar proteïnes clau per la regulació de l'homeòstasi energètica. Així, es va determinar l'expressió de la forma total i fosforilada de les proteïnes AMPK i mTOR. S'obtingué que els nivells de p-AMPK (Thr<sup>172</sup>) estaven incrementats en el grup glucosa respecte els altres dos grups (Figura V-55A), mentre que els nivells de p-mTOR (Ser<sup>2481</sup>) estaven augmentats en els dos grups suplementats amb sucre (Figura V-55B). A més, l'increment en el grup fructosa va resultar significatiu respecte el grup glucosa. La forma total no es va modificar en cap de les dues proteïnes.

Per altra banda, també es van determinar els nivells de la proteïna SIRT1 així com de NAMPT, la qual sintetitza el coenzim NAD<sup>+</sup>, necessari per l'activitat de SIRT1. No obstant, no s'observaren canvis en l'expressió d'aquestes proteïnes (Figura V-56).

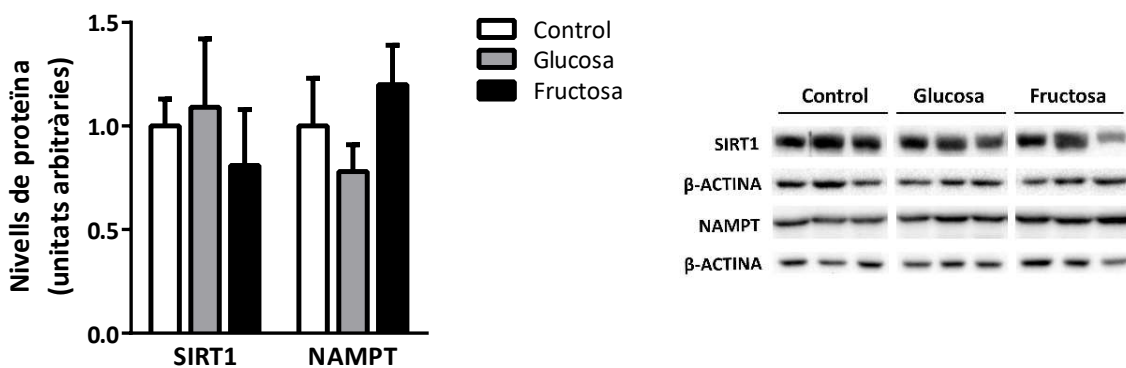
**A**



**B**



**Figura V-55.** Nivells de les proteïnes p-AMPK (Thr<sup>172</sup>) i AMPK (A) així com p-mTOR (Ser<sup>2481</sup>) i mTOR (B) en teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 vs control i #p<0.05 vs glucosa.



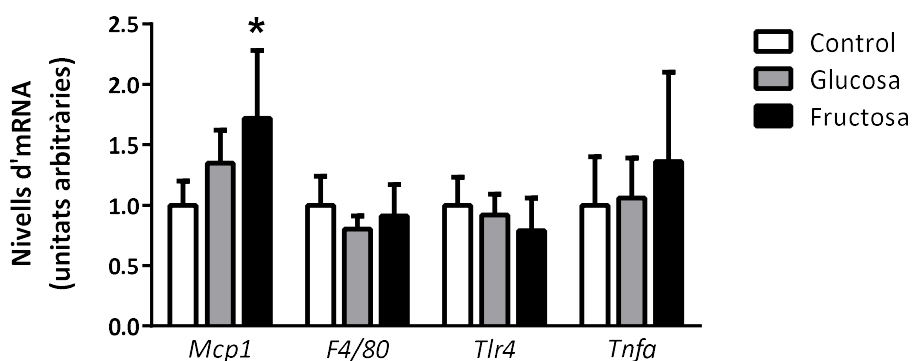
**Figura V-56.** Nivells de les proteïnes SIRT1 i NAMPT en extractes hepàtics de proteïna nuclear i total, respectivament. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD (n=4-5 rates/grup).

## 2.6. Efectes en la inflamació, l'estrès oxidatiu i l'estrès de reticle endoplasmàtic

### 2.6.1. Efectes en la inflamació i l'estrès oxidatiu

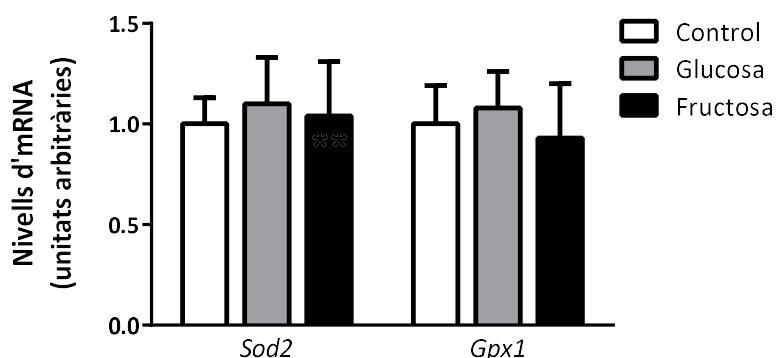
Considerant que la ingesta d'altres quantitats de sucres pot induir un procés inflamatori i l'aparició d'estrès oxidatiu en el fetge, es van valorar diferents marcadors indicatius d'aquestes alteracions.

Així, s'analitzà l'expressió gènica de diferents marcadors inflamatoris en el fetge: MCP1, F4/80, TNF $\alpha$  i TLR4. Únicament es van modificar els nivells d'mRNA del gen *Mcp1*, els quals estaven incrementats en els grups suplementats amb sucre, tot i que les diferències només van ser significatives en el grup fructosa (Figura V-57).



**Figura V-57.** Nivells d'mRNA de *Mcp1*, *F4/80*, *Tlr4* i *Tnfa* en el teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

Respecte l'estrès oxidatiu, es van quantificar els nivells d'mRNA dels enzims antioxidants Sod2 i Gpx1 i no s'observaren diferències entre els grups d'estudi (Figura V-58).

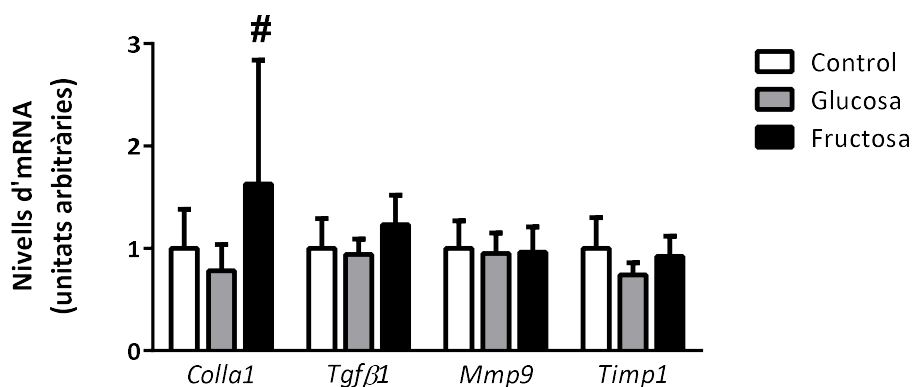


**Figura V-58.** Nivells d'mRNA de *Sod2* i *Gpx1* en el teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup).

### 2.6.2. Estudi de la fibrosi i la necrosi hepàtica

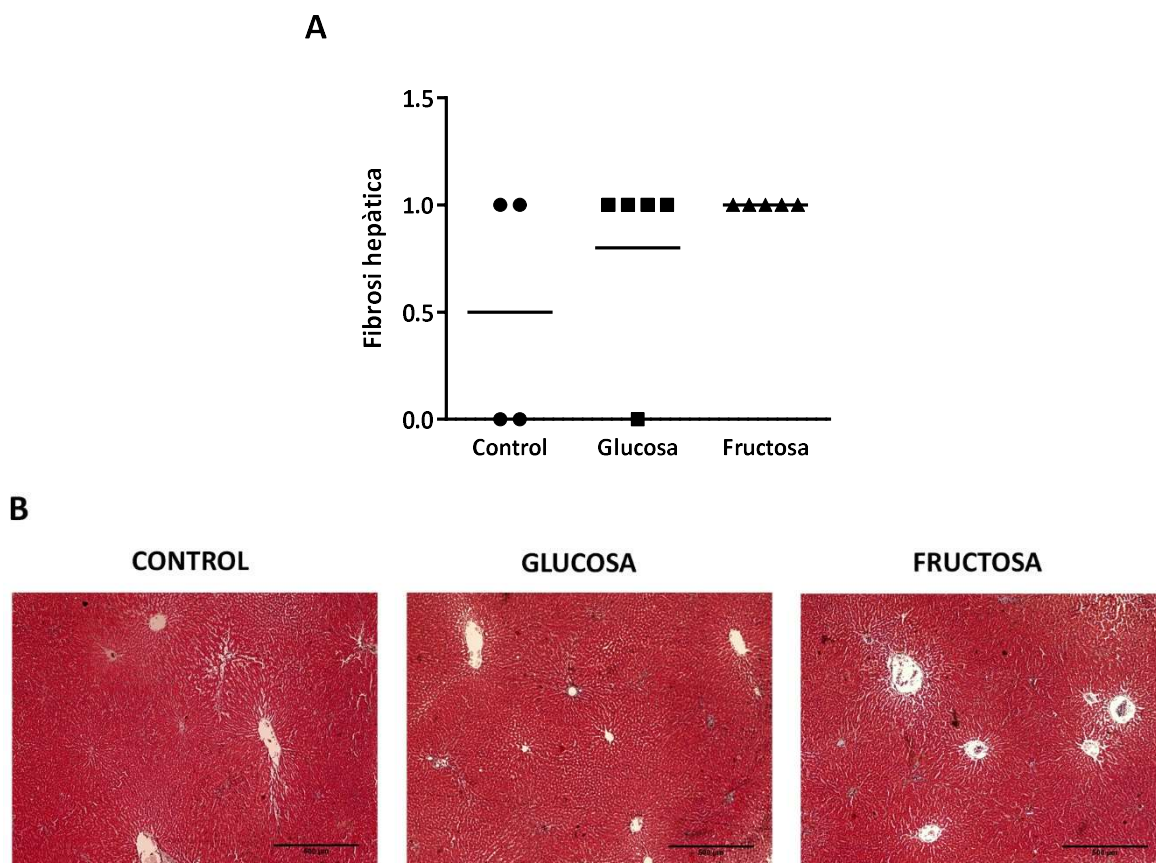
La fibrosi i necrosi del teixit hepàtic són alteracions que poden resultar com a conseqüència d'una patologia del fetge.

Pel que fa a la fibrosi, es determinà l'expressió gènica de diferents marcadors, com ara *Colla1*, *TGFβ1*, *MMP9* i *TIMP1*. Excepte *Colla1* que va presentar uns nivells superiors en el grup suplementat amb fructosa respecte el glucosa, la ingesta de sucres durant 28 setmanes no va modificar els marcadors de fibrosi (Figura V-59).



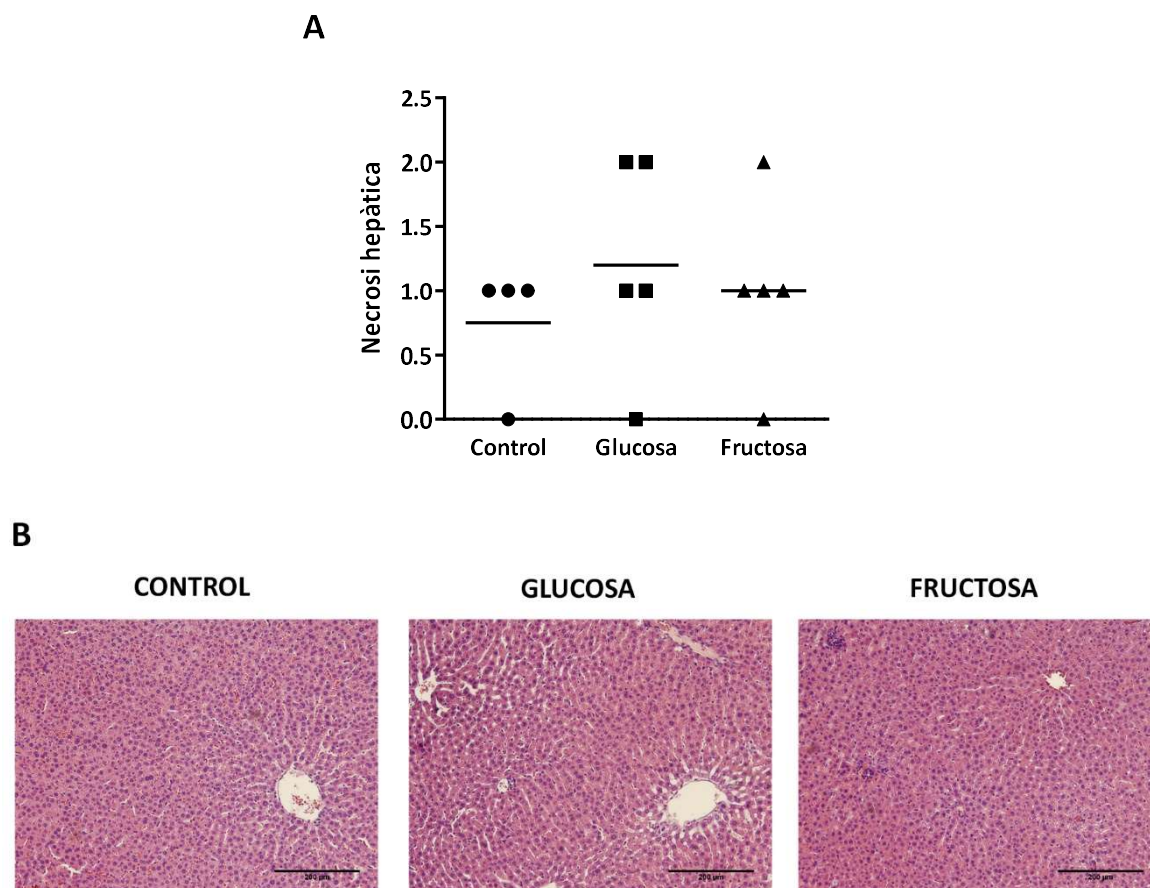
**Figura V-59.** Nivells d'mRNA de *Colla1*, *Tgfβ1*, *Mmp9* i *Timp1* en el teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD (n=8 rates/grup). #p<0.05 vs glucosa.

Aquests resultats van coincidir amb els obtinguts en la valoració histològica de la fibrosi del teixit hepàtic, mitjançant la tinció tricròmica de Masson, la qual no va mostrar diferències entre els grups d'estudi (Figura V-60).



**Figura V-60.** Valoració de la fibrosi hepàtica a partir dels talls histològics de fetge tenyits amb tricròmic de Masson (A) i imatges representatives dels talls histològics de fetge tenyits amb tricròmic de Masson (B). (n=4-5 rates/grup).

Així mateix, també es va estudiar si la ingesta de glucosa i fructosa induïa la necrosi del teixit hepàtic. La valoració, realitzada a través de la tinció H/E, va confirmar que no hi havia diferències entre els grups (Figura V-61).



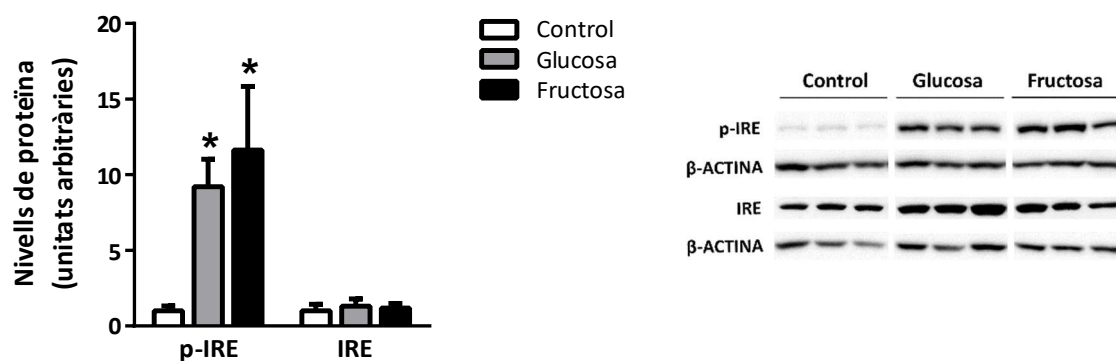
**Figura V-61.** Valoració de la necrosi hepàtica a partir dels talls histològics de fetge tenyits amb H/E (A) i imatges representatives dels talls histològics de fetge tenyits amb H/E (B). (n=4-5 rates/grup).

### 2.6.3. Efectes en l'estrès de reticle endoplasmàtic

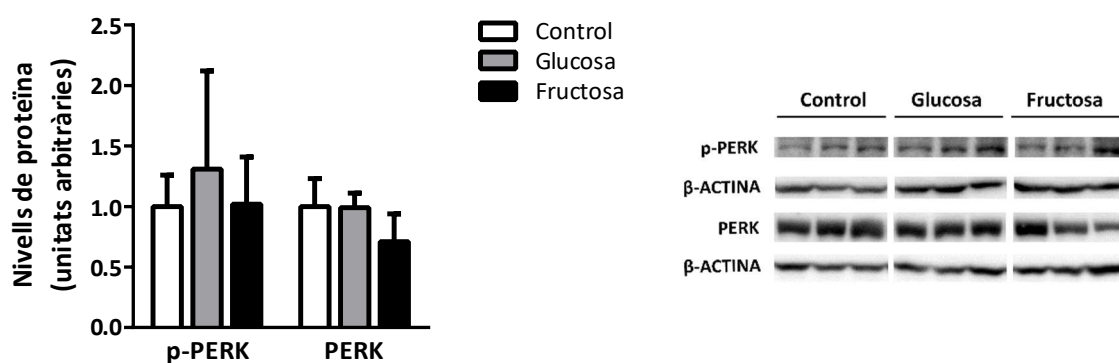
Donada la importància que té l'ER en la regulació de l'homeòstasi cel·lular, es va voler determinar si hi havia un increment de la resposta UPR com a conseqüència del desenvolupament d'estrès d'ER.

En aquest sentit, es van analitzar les tres branques de la resposta UPR. S'obtingué que la forma fosforilada d'IRE1 presentava un fort increment en els dos grups suplementats amb sucre (9.21 i 11.63 vegades en el grup glucosa i fructosa, respectivament), mentre que la forma total no es veia afectada (Figura V-62A). Pel que fa a la via PERK, no es van obtenir diferències entre els grups (Figura V-62B) però, en canvi en la via iniciada per ATF6, sí que s'observà un increment de l'expressió proteica d'ATF6 en l'extracte nuclear hepàtic de les rates del grup fructosa (Figura V-62C).

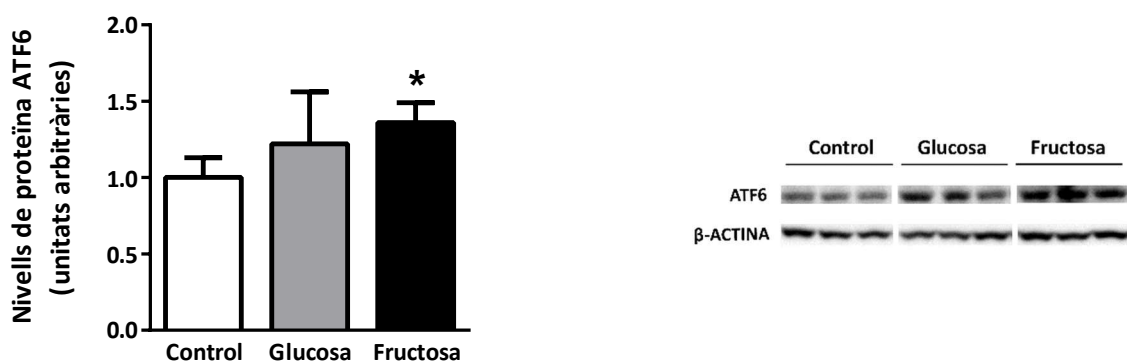
A



B

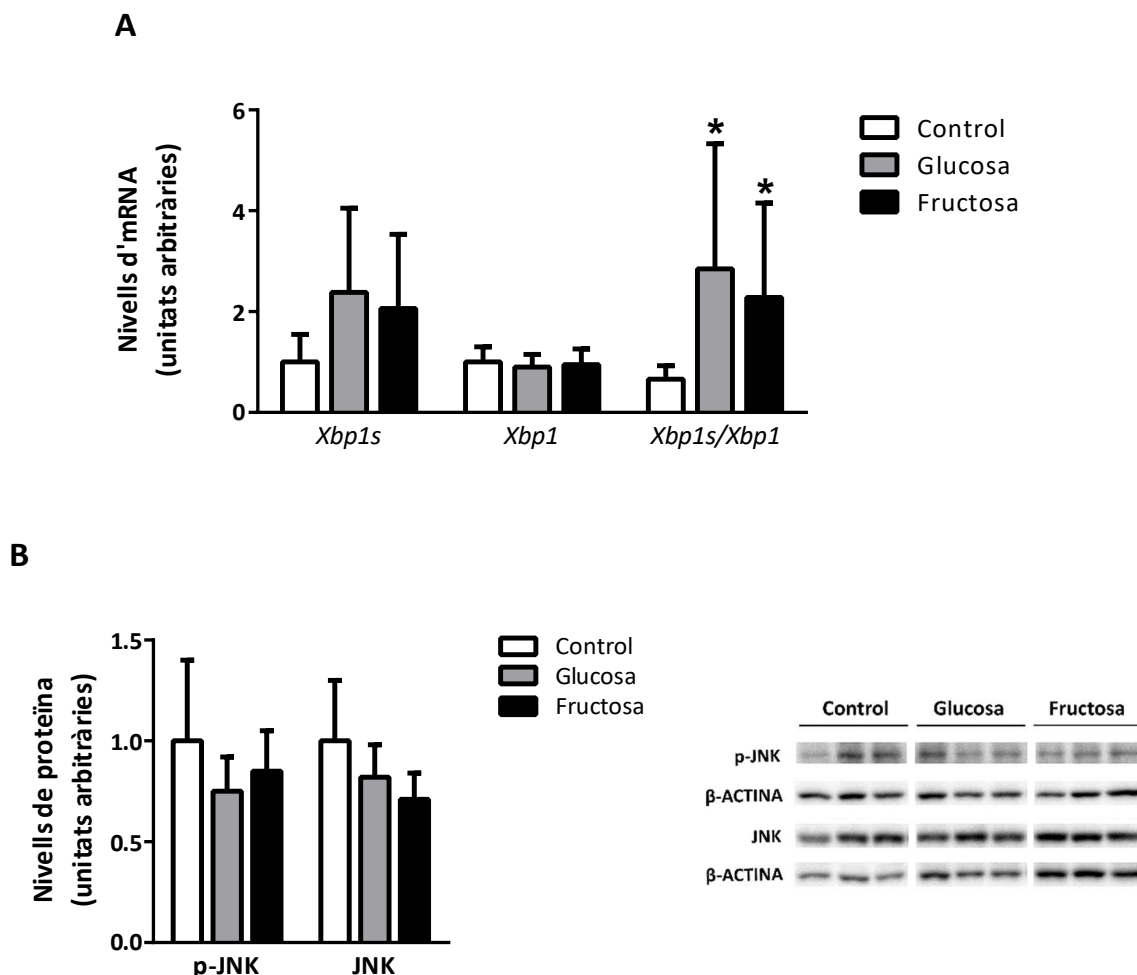


C



**Figura V-62.** Nivells de les proteïnes p-IRE (Ser<sup>724</sup>) i IRE (A), p-PERK (Thr<sup>981</sup>) i PERK (B) en extractes hepàtics de proteïna total i ATF6 (C) en extractes hepàtics de proteïna nuclear. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

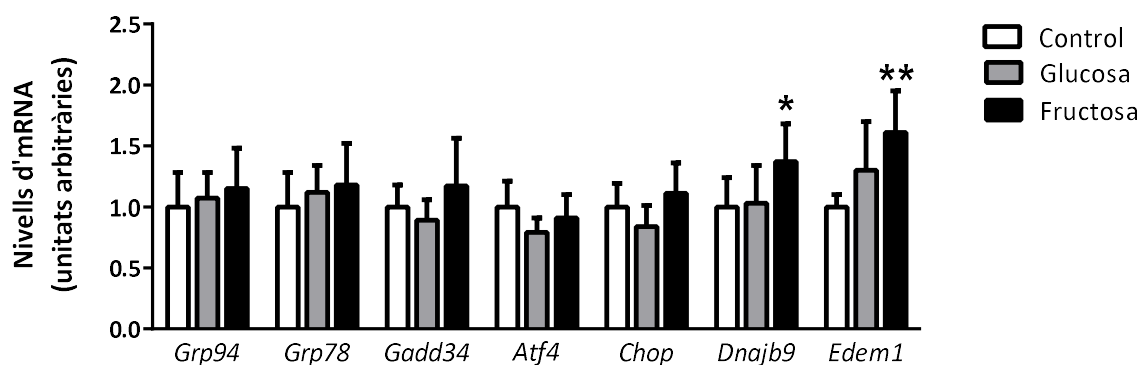
Donada l'activació d'IRE1, es va prosseguir a l'estudi de la seva via. Així, es determinaren els nivells d'mRNA d'*Xbp1s* respecte *Xbp1*, els quals van resultar estar incrementats en els grup glucosa i fructosa (Figura V-63A). En canvi, no s'observà l'activació per fosforilació de JNK, promoguda també per IRE1, en cap dels grups (Figura V-63B).



**Figura V-63.** Nivells d'mRNA d'*Xbp1s*, *Xbp1* i valors de la relació *Xbp1s/Xbp1* (A), així com nivells de les proteïnes p-JNK i JNK en teixit hepàtic (B). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup per l'expressió gènica i n=4-5 rates/grup per l'expressió proteica). \*p<0.05 vs control.

També es va analitzar l'expressió de diferents gens implicats en l'estrès d'ER. Així, s'obtingué que els nivells d'mRNA de les xaperones *Grp94* i *Grp78*, així com gens diana de la via de PERK (*Gadd34*, *Atf4*, *Chop*) no es van veure alterats per la suplementació de sucre. En canvi, gens com *Dnajb9* i *Edem1*, implicats en el procés ERAD i induïts per XBP1 i ATF6 sí que es van veure incrementats significativament només en el grup fructosa (Figura V-64).





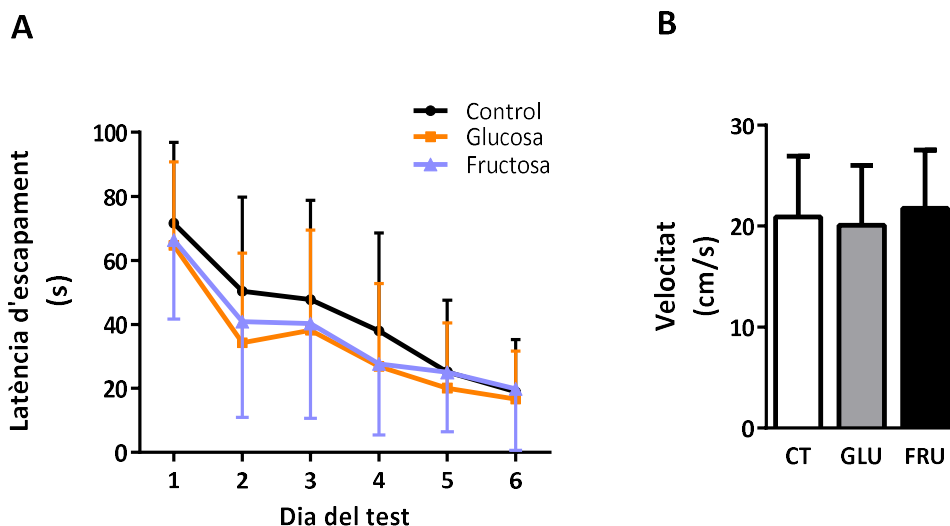
**Figura V-64.** Nivells d'mRNA de *Grp94*, *Grp78*, *Gadd34*, *Atf4*, *Chop*, *Dnajb9* i *Edem1* en el teixit hepàtic. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*p<0.05 i \*\*p<0.01 vs control.

## 2.7. Estudi de la funció cognitiva

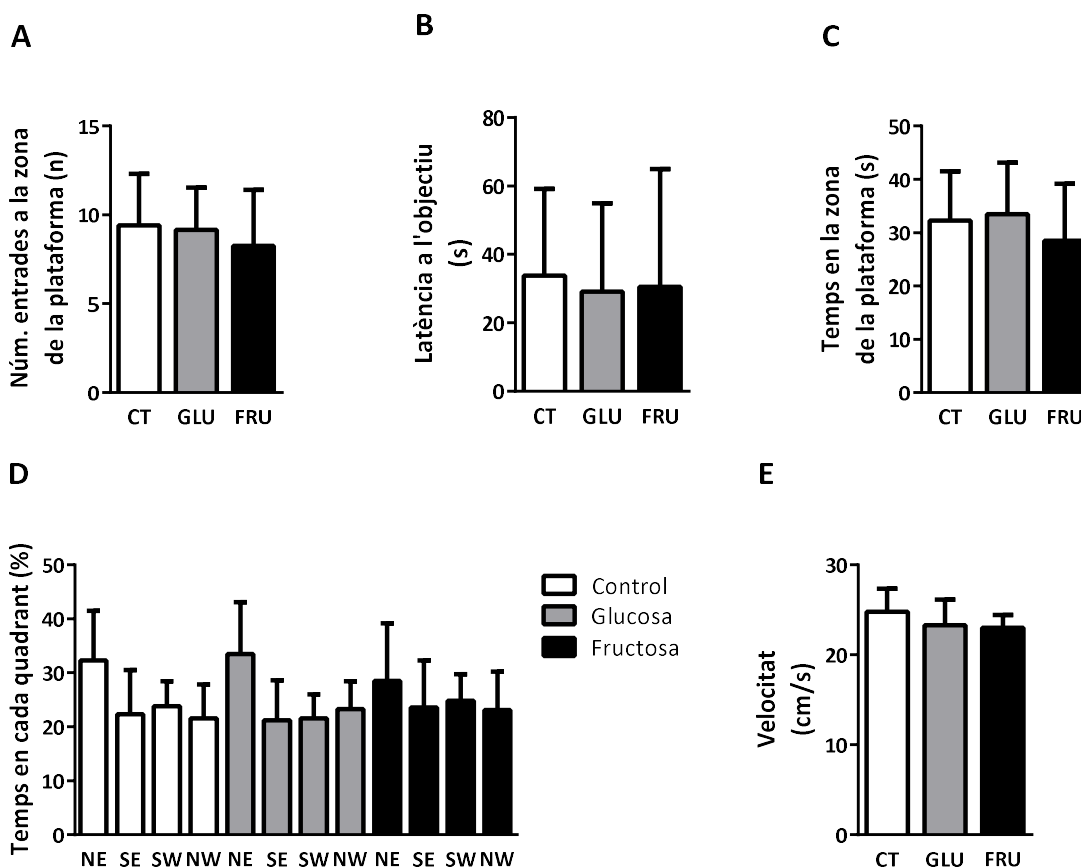
### 2.7.1. Tests de memòria i aprenentatge: MWM i NORT

Per tal de conèixer si la ingesta de sucre alterava els processos cognitius de memòria i aprenentatge després d'una suplementació a curt i/o a llarg termini, es van realitzar dos tests cognitius, l'MWM i el NORT a l'inici i al final de la suplementació.

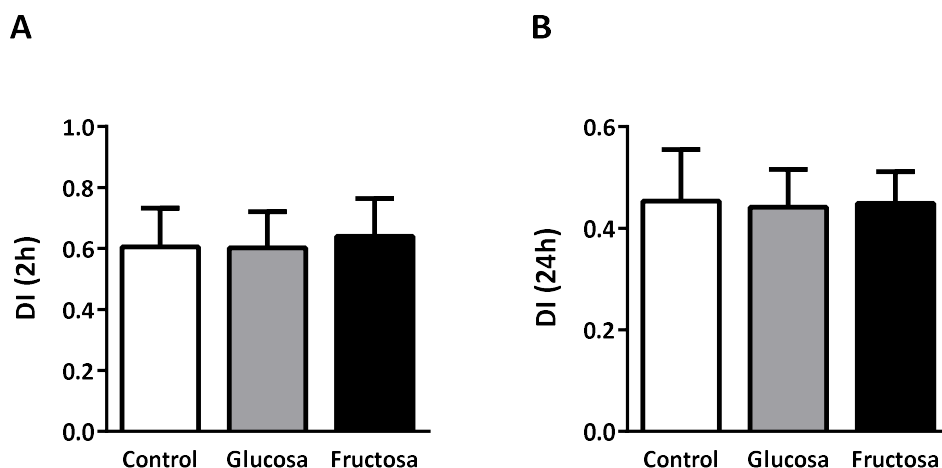
La suplementació a curt termini (2-3 setmanes) no va produir alteracions en cap dels tests realitzats. Així, en l'MWM no es van observar canvis en la corba d'aprenentatge (Figura V-65) ni en el test (Figura V-66). Els resultats del NORT tampoc van mostrar diferències entre les rates dels diferents grups (Figura V-67).



**Figura V-65.** Representació gràfica de la corba d'aprenentatge (A) i la velocitat de natació de les rates durant la fase d'aprenentatge de l'MWM realitzat després d'una suplementació a curt termini. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=12 rates/grup).

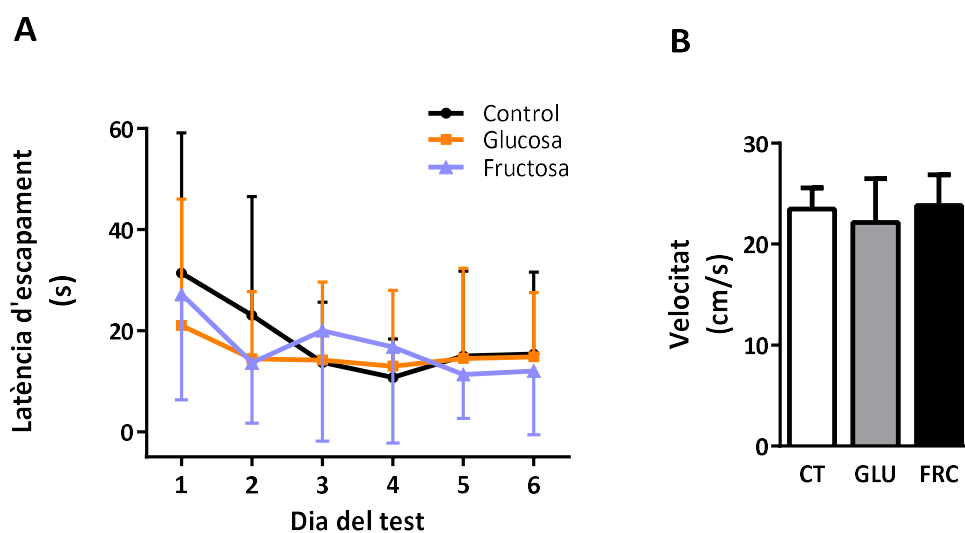


**Figura V-66.** Diferents paràmetres analitzats al dia del test de l'MWM realitzat després d'una suplementació a curt termini: número d'entrades a la zona de la plataforma (A), latència a l'objectiu (B), temps en la zona de la plataforma (C), temps en cada quadrant (D) i velocitat (E). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=12 rates/grup).

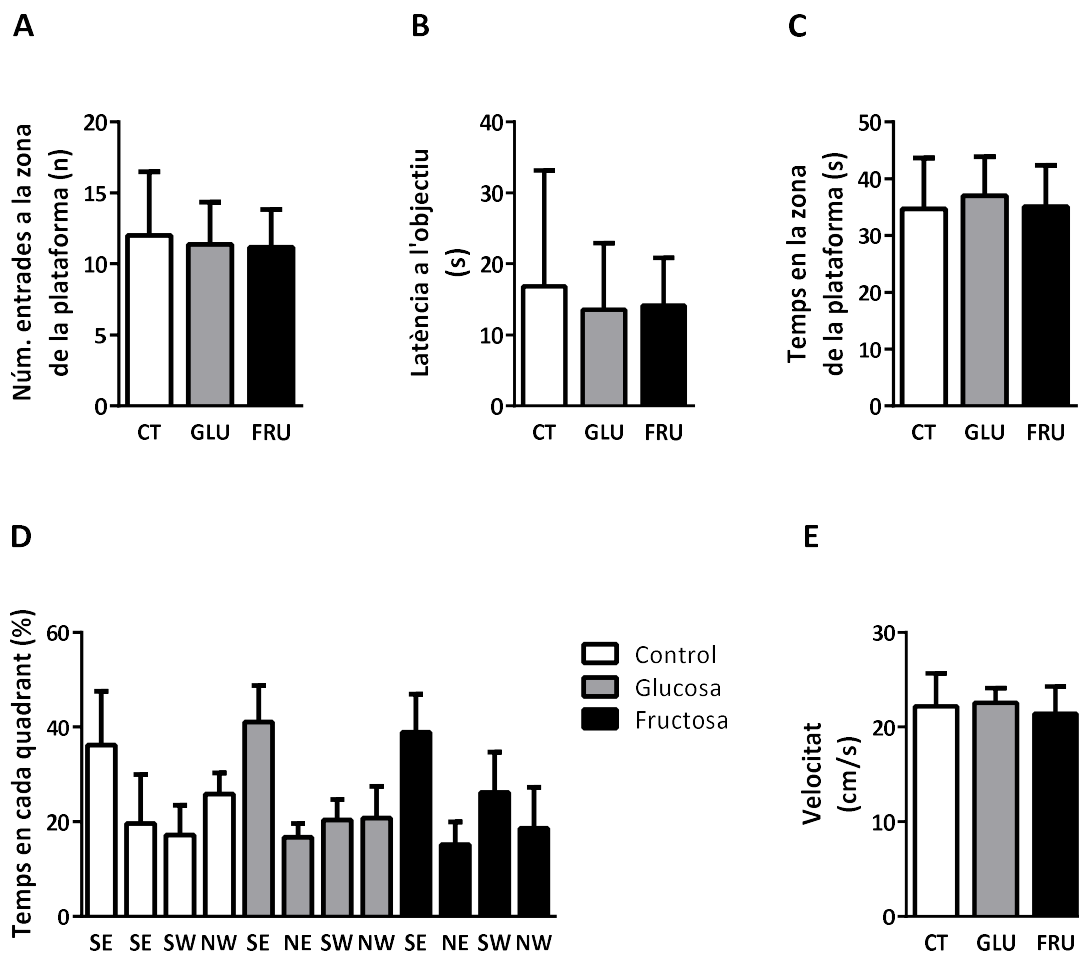


**Figura V-67.** DI del test NORT a les 2 h (A) i a les 24 h (B) realitzat després d'una suplementació a curt termini. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=12 rates/grup).

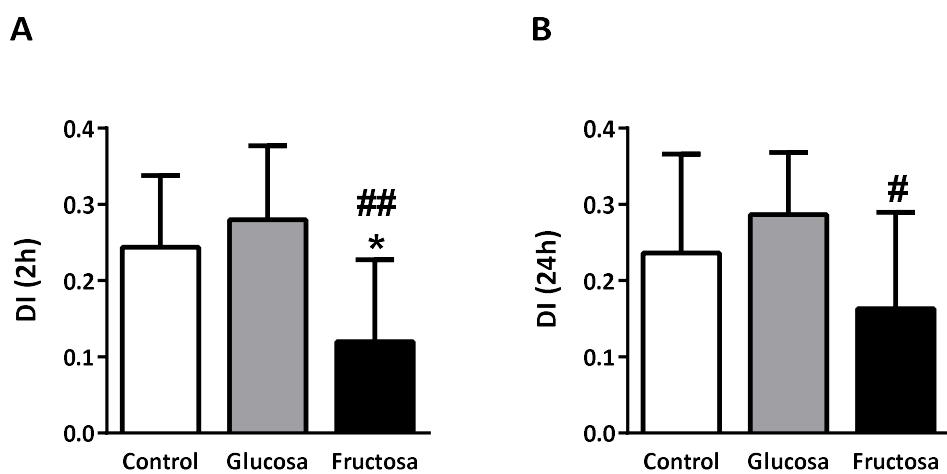
Pel que fa als tests realitzats després d'una suplementació a llarg termini (27-28 setmanes), no es van obtenir diferències en la corba d'aprenentatge (Figura V-68) ni en cap dels paràmetres analitzats del dia del test de l'MWM (Figura V-69). En canvi, els DI obtinguts en el test NORT realitzats tant a 2 h com a 24 h van disminuir significativament només en el grup fructosa (Figura V-70).



**Figura V-68.** Representació gràfica de la corba d'aprenentatge (A) i la velocitat de natació de les rates durant la fase d'aprenentatge de l'MWM realitzat després d'una suplementació a llarg termini. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=10-12 rates/grup).



**Figura V-69.** Diferents paràmetres analitzats al dia del test de l'MWM realitzat després d'una suplementació a llarg termini: número d'entrades a la zona de la plataforma (A), latència a l'objectiu (B), temps en la zona de la plataforma (C), temps en cada quadrant (D) i velocitat (E). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=10-12 rates/grup).

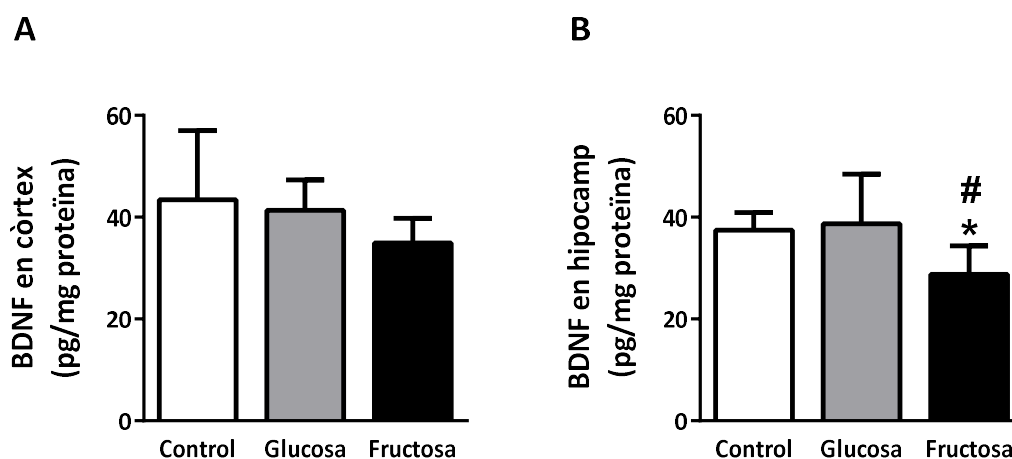


**Figura V-70.** DI del test NORT a les 2 h (A) i a les 24 h (B) realitzat després d'una suplementació a llarg termini. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=10-12 rates/grup). \*p<0.05 vs control i #p<0.05, ##p<0.01 vs glucosa.

### 2.7.2. Efectes en la plasticitat sinàptica

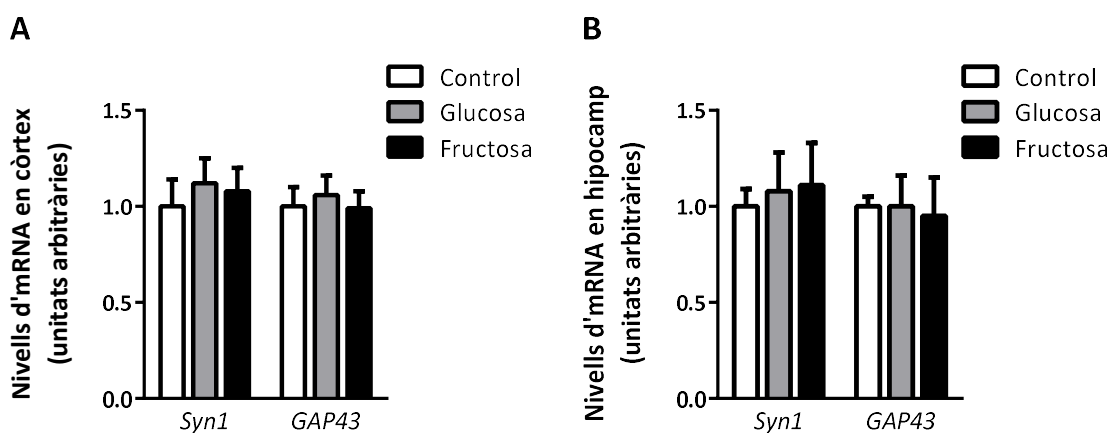
S'estudià si el consum de sucres causava alteracions de la plasticitat sinàptica en el còrtex i l'hipocamp, dues zones del CNS de gran importància en els processos d'aprenentatge i memòria.

La determinació de la concentració de BDNF mitjançant la tècnica ELISA, va mostrar com tant en l'hipocamp com en el còrtex hi havia una disminució de la seva concentració únicament en el grup fructosa. No obstant, aquesta reducció només resultà ser significativa en l'hipocamp (Figura V-71).



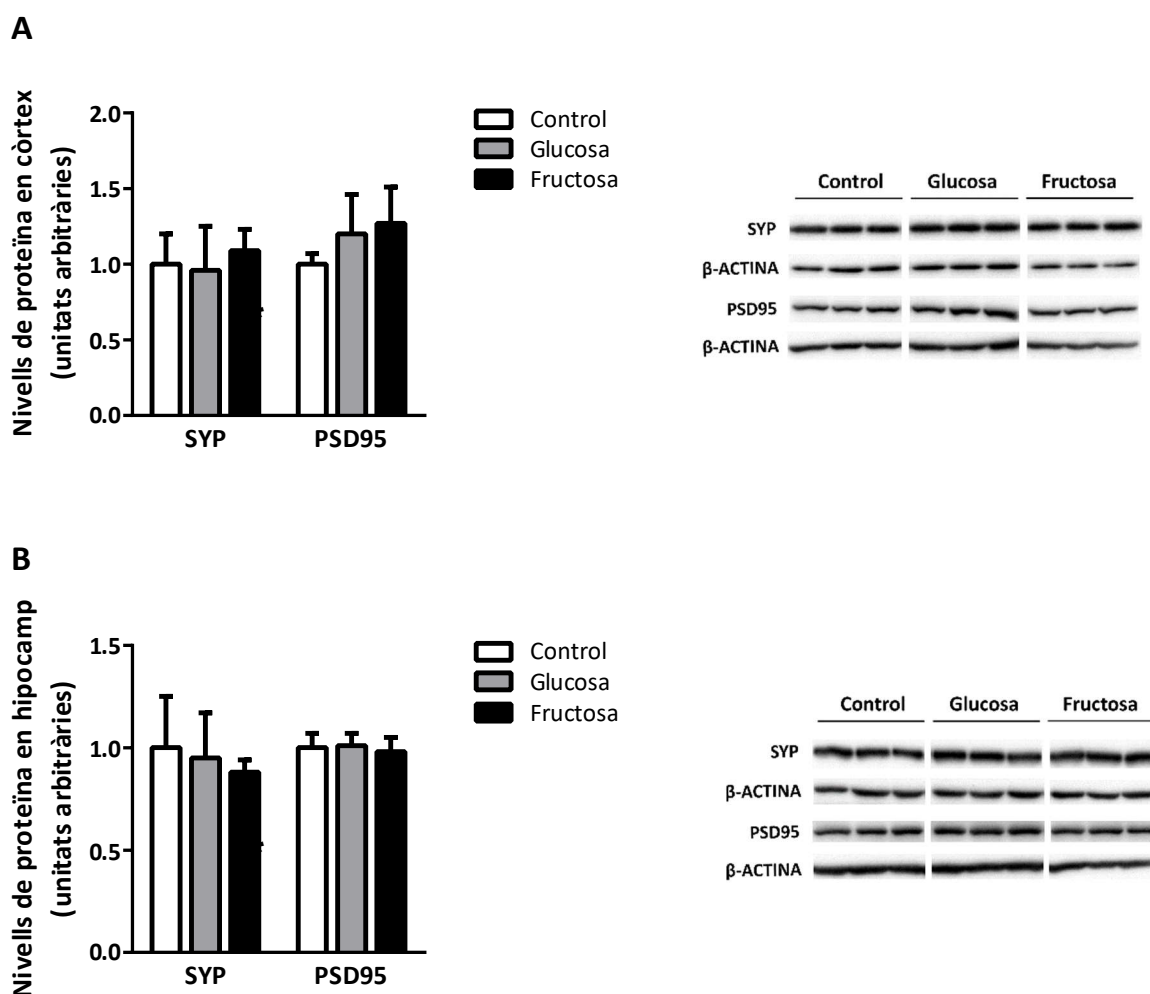
**Figura V-71.** Concentració de BDNF en el còrtex (A) i en l'hipocamp (B) analitzada mitjançant la tècnica ELISA. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=7-8 rates/grup).

Donats aquests resultats, es van analitzar els nivells d'mRNA de *Syn1* i *Gap43*, dues neurotrofines estimulades per BDNF. No obstant, no es van detectar canvis en l'expressió gènica entre els grups d'estudi ni en còrtex ni en hipocamp (Figura V-72).



**Figura V-72.** Nivells d'mRNA de *Syn1* i *GAP43* en còrtex (A) i en hipocamp (B). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup).

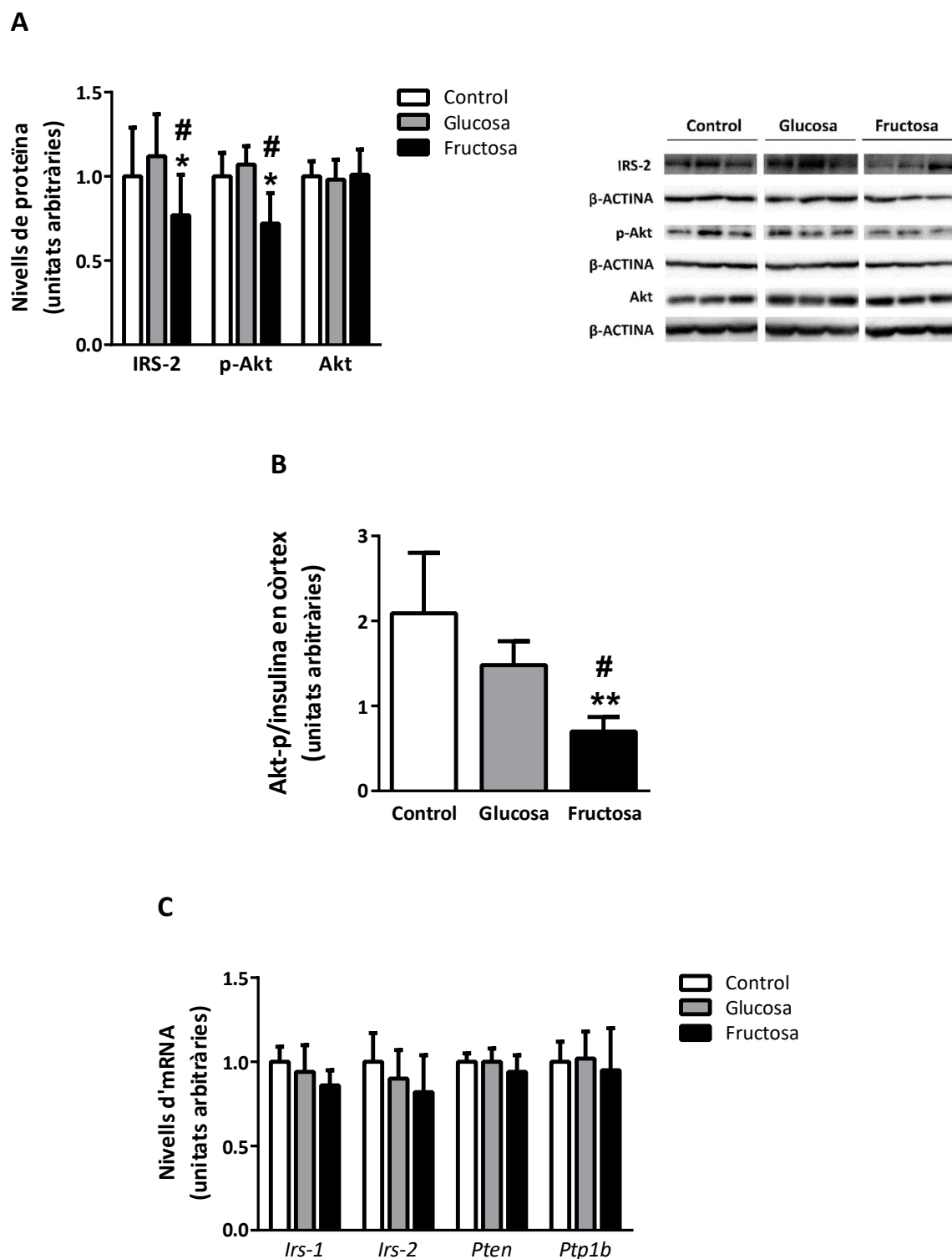
Tampoc s'obtingueren canvis significatius en l'expressió proteica de SYP i PSD95 en cap de les zones valorades (Figura V-73).



**Figura V-73.** Nivells de les proteïnes SYP i PSD95 en còrtex (A) i hipocamp (B). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup).

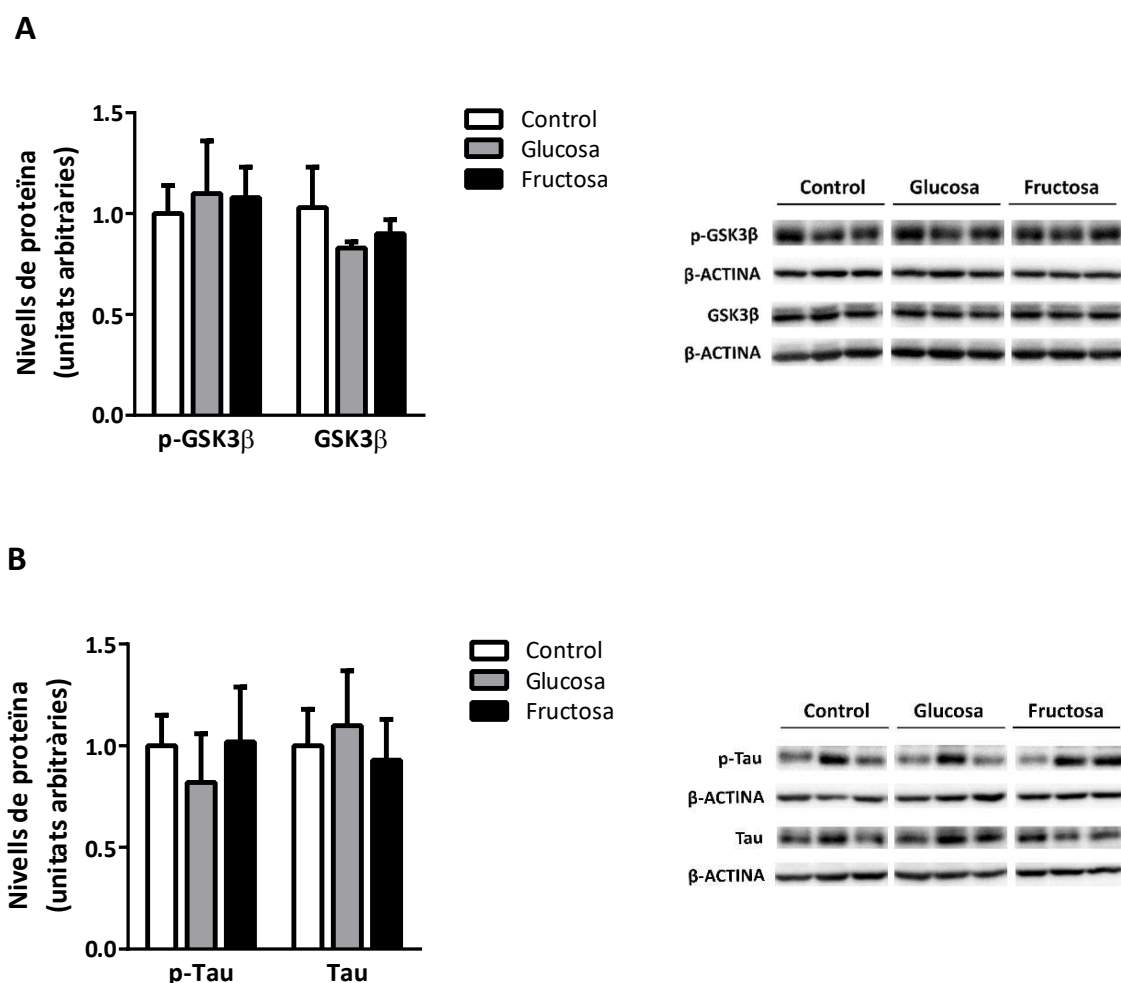
### 2.7.3. Efectes en la via de senyalització de la insulina

La via de senyalització de la insulina es va veure afectada en el còrtex de les rates suplementades amb fructosa, ja que s'observà una disminució de l'expressió proteica d'IRS-2 així com de la fosforilació de la proteïna Akt (Ser<sup>473</sup>) (Figura V-74A). A més, si es considera en funció de la concentració d'insulina en plasma, encara s'evidencia més aquesta diferència (Figura V-74B). Tot i això, els nivells d'mRNA d'*Irs-1* i *Irs-2*, així com de molècules que indueixen a la resistència a la insulina (*Socs3*, *Pten* i *Ptp1B*) no es modificaren (Figura V-74C).



**Figura V-74.** Nivells de les proteïnes IRS-2, p-Akt (Ser<sup>473</sup>) i Akt (A), nivells de p-Akt en funció de la concentració d'insulina (B) així com nivells d'mRNA d'*Irs-1*, *Irs-2*, *Pten* i *Ptp1b* (C) en còrtex. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup per l'expressió gènica i n=4-5 rates/grup per l'expressió proteica). \*p<0.05 i \*\*p<0.01 vs control i #p<0.05 vs glucosa.

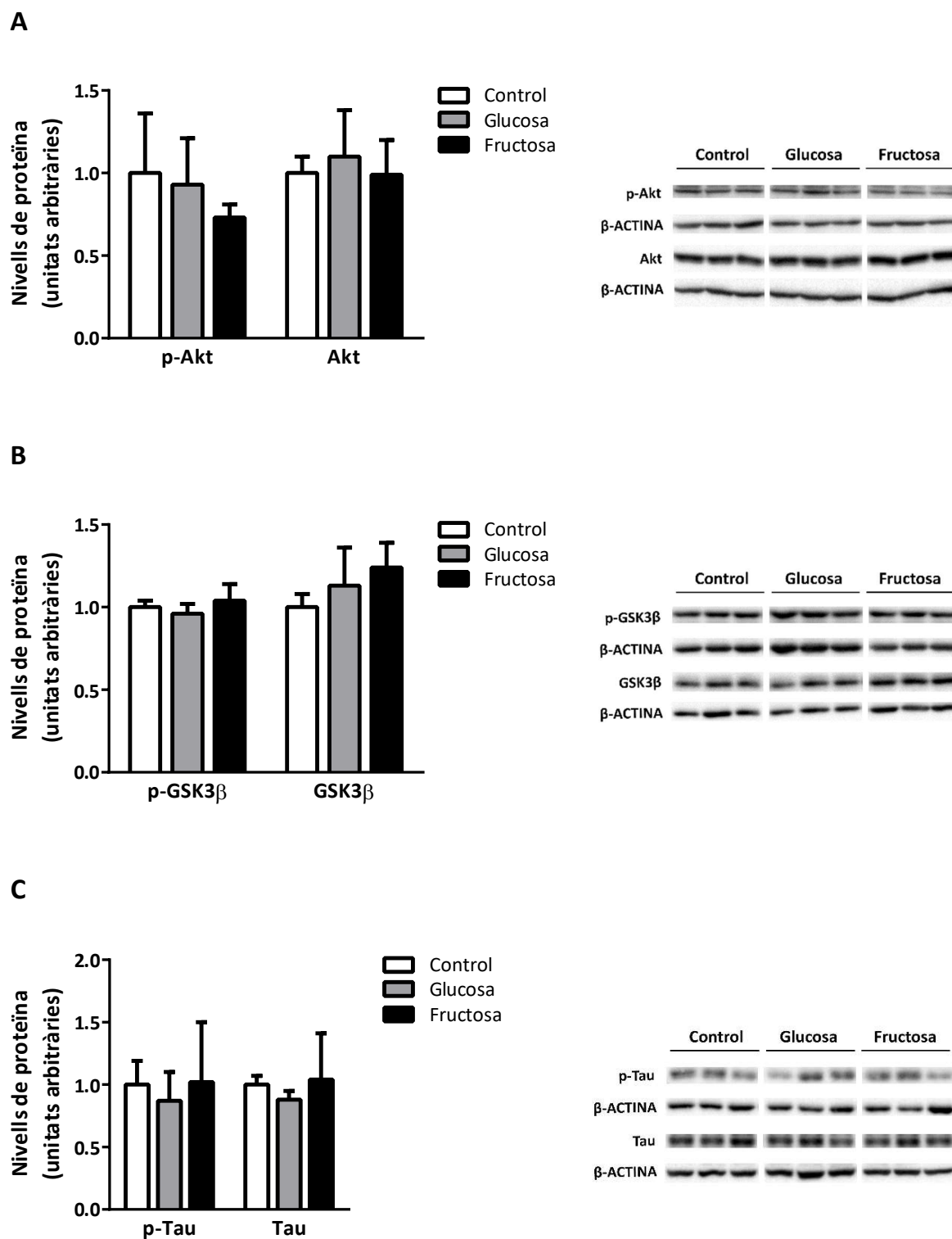
L'activació d'Akt comporta la fosforilació de GSK-3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) que, al seu torn, regula la fosforilació de la proteïna Tau. No obstant, els nivells proteics de p-GSK-3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>), p-Tau (Ser<sup>404</sup>) i Tau no es van veure alterats (Figura V-75).



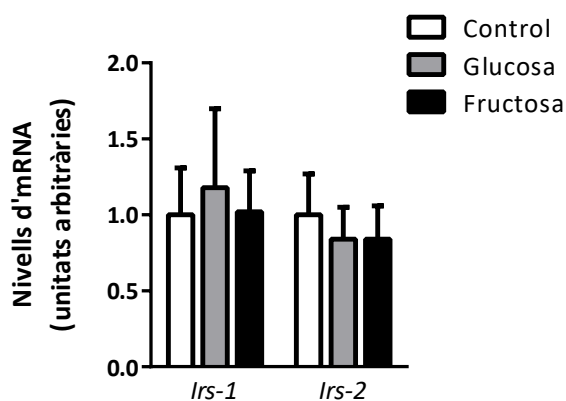
**Figura V-75.** Nivells de les proteïnes p-GSK3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) i GSK3 $\beta$  (A) i p-Tau (Ser<sup>404</sup>) i Tau (B) en còrtex. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup).

Pel que fa a l'hipocamp, no es van observar diferències significatives entre l'expressió de cap de les proteïnes de la via de la insulina analitzades, tot i que sí que es va observar una tendència a la reducció de la fosforilació d'Akt (Ser<sup>473</sup>) (Figura V-76). Tampoc es detectaren alteracions en l'expressió gènica d'IRS-1 i IRS-2 (Figura V-77).



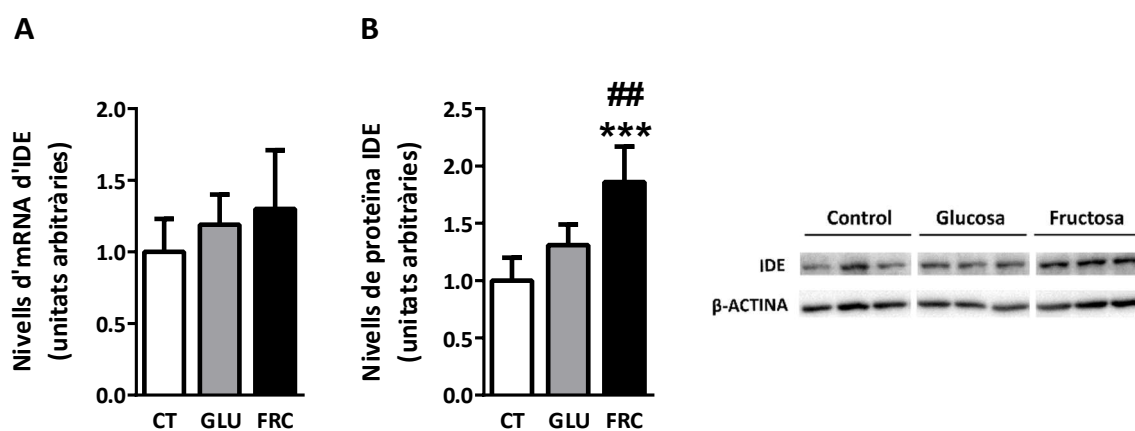


**Figura V-76.** Nivells de les proteïnes p-Akt (Ser473) i Akt (A), p-GSK3β (Ser<sup>9</sup>) i GSK3β (B), p-Tau (Ser<sup>404</sup>) i Tau (C) en hipocamp. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD (n=4-5 rates/grup).

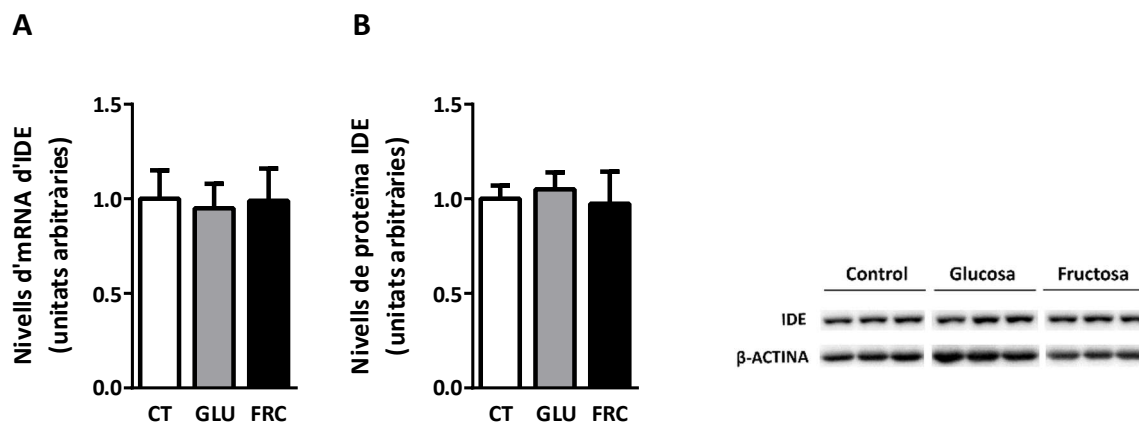


**Figura V-77.** Nivells d'mRNA d'*Irs-1* i *Irs-2* en hipocamp. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup).

Considerant la hiperinsulinèmia dels animals del grup fructosa, i l'alteració de la senyalització de la insulina en còrtex, es va analitzar els nivells d'IDE. Tant l'expressió proteica com gènica va mostrar un increment en el còrtex dels animals del grup fructosa, tot i que només l'anàlisi dels nivells de proteïna resultà significatiu (Figura V-78). En canvi, en l'hipocamp, no s'obtingueren diferències en l'expressió d'IDE entre els grups d'estudi (Figura V-79).

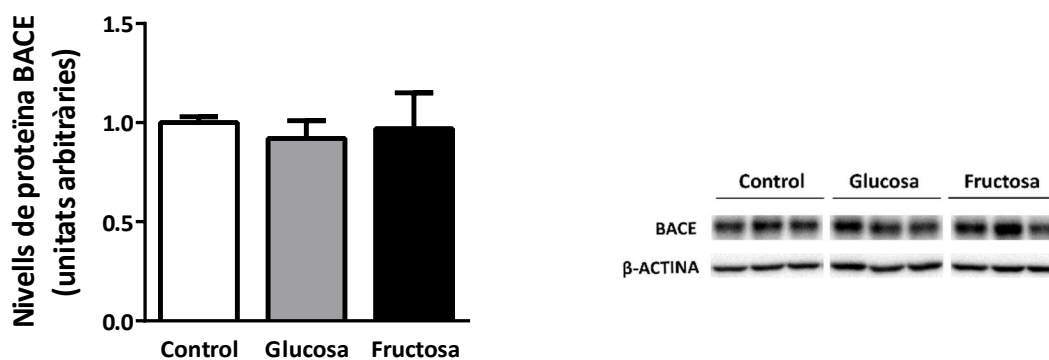


**Figura V-78.** Nivells d'mRNA i de proteïna IDE en còrtex (A i B). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup per l'expressió gènica i n=4-5 rates/grup per l'expressió proteica). \*\*\* $p$ <0.001 vs control i ## $p$ <0.01 vs glucosa.



**Figura V-79.** Nivells d'mRNA i de proteïna IDE en hipocamp (A i B). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup per l'expressió gènica i n=4-5 rates/grup per l'expressió proteica).

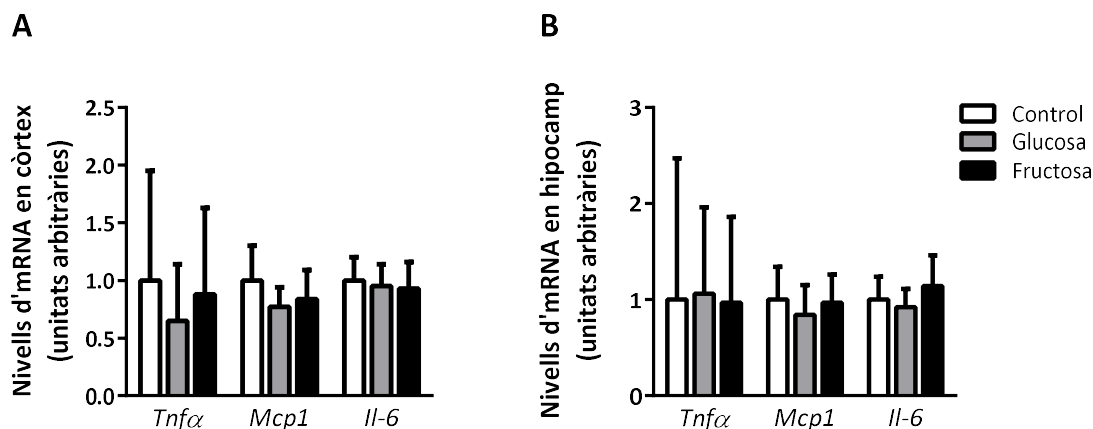
A part de la insulina, IDE també degrada altres pèptids com ara el  $\beta$ -amiloide. Per aquest motiu, es va valorar en còrtex els nivells de la proteïna BACE ( *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme*), un enzim que fragmenta la proteïna APP, induint a la formació de  $\beta$ -amiloide. Tanmateix, no es van observar diferències en la seva expressió (Figura V-80).



**Figura V-80.** Nivells de proteïna BACE en còrtex. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup).

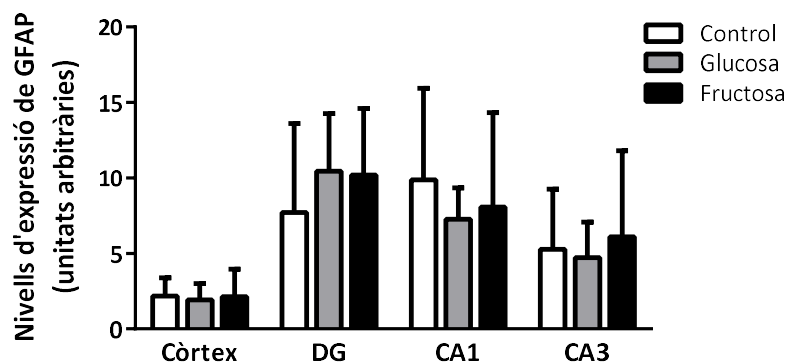
### 2.7.4. Efectes en la inflamació

La inflamació és un dels mecanismes que pot induir l'alteració de les funcions cognitives. Es determinaren els nivells d'mRNA de citocines inflammatòries (*Tnf $\alpha$* , *Mcp1* i *Il-6*), però no s'observaren canvis significatius ni en còrtex ni en hipocamp (Figura V-81).

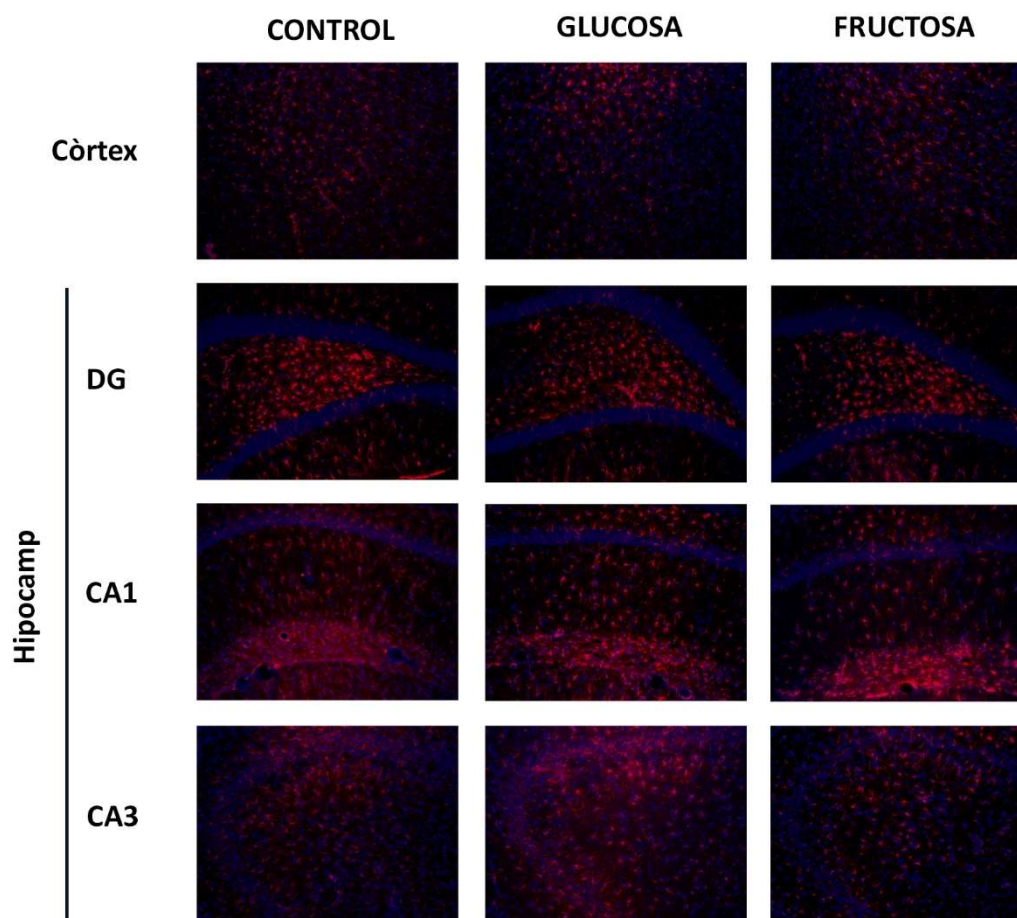


**Figura V-81.** Nivells d'mRNA de *Tnf $\alpha$* , *Mcp1* i *Il-6* en còrtex (A) i hipocamp (B). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup).

També es va realitzar una IHC per detectar GFAP, un marcador d'astrogliosi, en el còrtex i en diferents parts de l'hipocamp: CA (*Cornu Ammonis*) 1, CA3 i DG. Tanmateix, no s'observaren diferències entre els grups en estudi (Figura V-82-83).



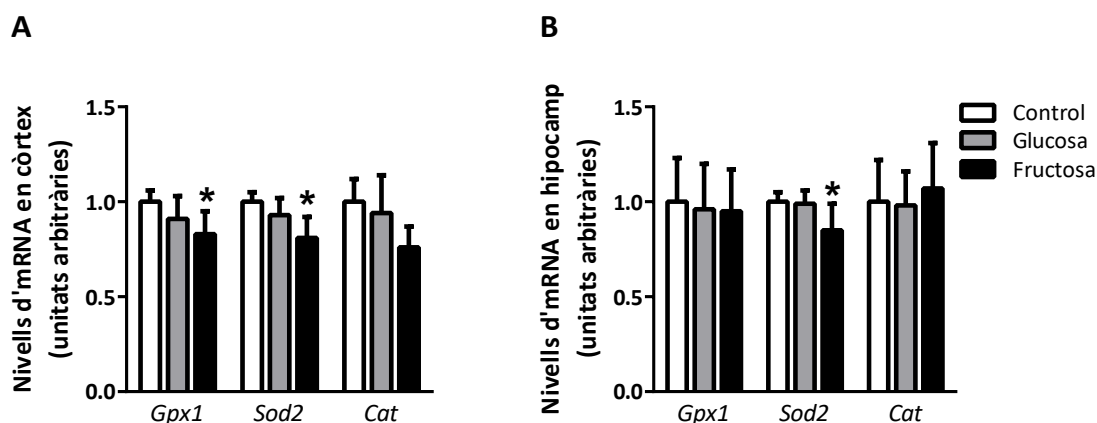
**Figura V-82.** Nivells d'expressió de GFAP determinades per IHC en diferents parts de l'hipocamp (DG, CA1 i CA3) i en còrtex. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup).



**Figura V-83.** Imatges representatives de l'expressió de GFAP determinades per IHC en diferents parts de l'hipocamp (DG, CA1 i CA3) i en còrtex.

#### 2.7.5. Efectes en l'estrès oxidatiu

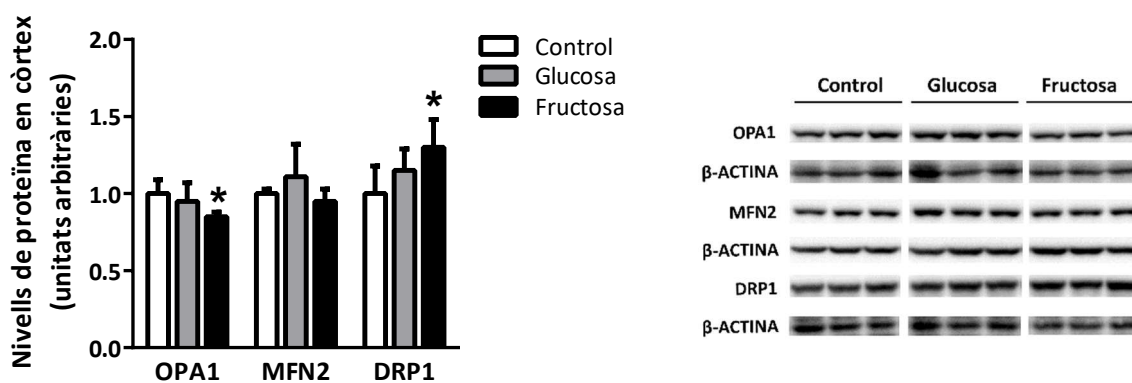
Per tal d'avaluar si la ingesta de sucres havia induït a l'estrès oxidatiu, es va valorar els nivells d'mRNA d'enzims antioxidants. S'observà que l'expressió gènica de *Gpx1*, *Sod2* i *Cat* va disminuir en el còrtex dels animals suplementats amb fructosa, tot i que la reducció de *Cat* no va resultar ser significativa (Figura V-84A). Pel que fa a l'hipocamp, s'obtingueren nivells d'mRNA de *Sod* inferiors en el grup fructosa respecte el grup control (Figura V-84B).



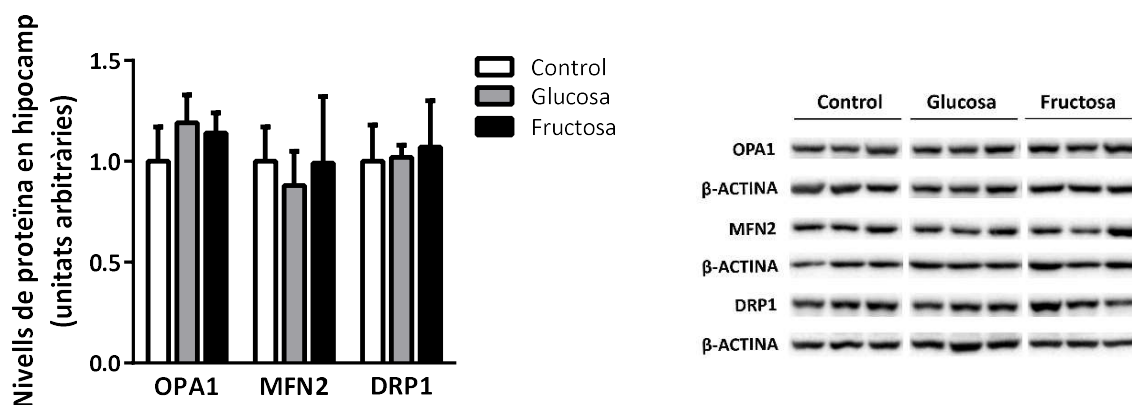
**Figura V-84.** Nivells d'mRNA de *Gpx1*, *Sod2* i *Cat* en còrtex (A) i hipocamp (B). Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

### 2.7.6. Efectes en la funció mitocondrial

La funció mitocondrial es va valorar a través de la determinació de l'expressió proteica de proteïnes de fusió (OPA1 i MFN2) i de fissió (DRP1). En el còrtex, s'observà que la ingesta de fructosa va produir una disminució d'OPA1, mentre que l'expressió proteica de DRP1 va augmentar, el que suggereix una disfunció de la biogènesi mitocondrial (Figura V-85). Pel contrari, la ingesta de glucosa no va produir cap canvi. Respecte l'hipocamp, no es detectaren diferències d'expressió en cap de les proteïnes analitzades (Figura V-86).



**Figura V-85.** Nivells de les proteïnes OPA1, MFN2 i DRP1 en còrtex. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup). \*p<0.05 vs control.

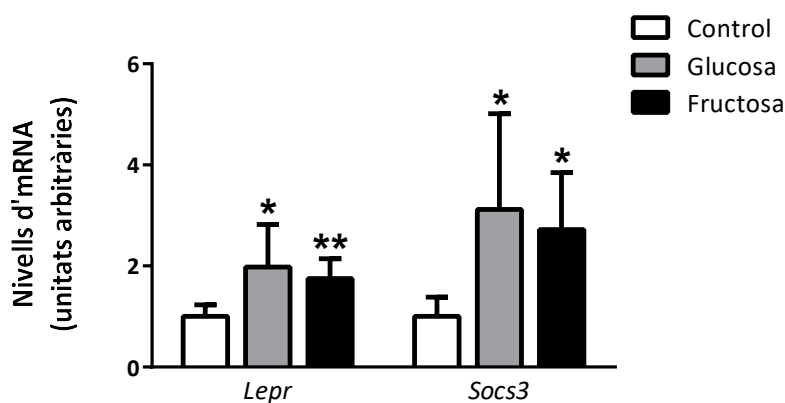


**Figura V-86.** Nivells de les proteïnes OPA1, MFN2 i DRP1 en hipocamp. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=4-5 rates/grup).

## 2.8. Efectes en l'hipotàlem

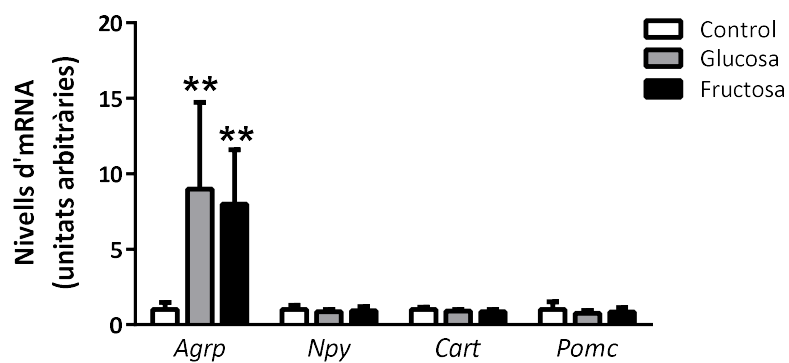
L'hipotàlem té un paper molt important en l'homeòstasi energètica, ja que controla l'alliberament de diferents hormones i neuropèptids que regulen la ingesta.

Així, es comprovà si la via de senyalització de la leptina estava afectada en l'hipotàlem. S'observà que tant la ingesta de glucosa com de fructosa produïen un increment en els nivells d'mRNA de *Lepr* i de *Socs3*, suggerint que s'havia desenvolupat una resistència a la leptina (Figura V-87).



**Figura V-87.** Nivells d'mRNA de *Lepr* i *Socs3* en hipotàlem. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \* $p < 0.05$  i \*\* $p < 0.01$  vs control.

En aquest sentit, es va determinar l'expressió gènica dels pèptids orexigènics (AgRP i NPY) i els anorexigènics (CART i POMC) regulats principalment per la leptina. Tot i que només s'obtingueren canvis en els nivells d'mRNA d'*AgRP*, aquest pèptid presentà un increment de 8.97 i de 7.99 vegades en el grup glucosa i fructosa respectivament, evidenciant una manca de regulació per part de la leptina (Figura V-88).



**Figura V-88.** Nivells d'mRNA d'*Agrp*, *Npy*, *Cart* i *Pomc* en hipotàlem. Els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD (n=8 rates/grup). \*\*p<0.01 vs control.



## VI. DISCUSSIÓ



Nombrosos estudis han descrit els efectes adversos que produeix la ingesta de sucres simples, i especialment de fructosa [16,32]. En aquest sentit, la rata és un bon model animal per estudiar els efectes del seu consum, ja que no només metabolitza els sucres d'una manera similar als humans, sinó que també desenvolupa unes alteracions metabòliques semblants [5].

Actualment, les begudes ensucrades són la principal font de consum de sucres simples. Per aquest motiu, models animals suplementats amb sucres en forma líquida mimetitzen el patró de consum humà. A més, permeten una ingesta de fructosa diària equivalent a la que consumeix el quartil superior de la població humana [6].

El nostre grup de recerca ha demostrat en diferents estudis que la ingesta de fructosa al 10% (p/v) en l'aigua de beguda durant 14 i 56 dies en rates femella produeix hipertrigliceridèmia, esteatosi hepàtica i un dèficit de la senyalització de la insulina, entre d'altres alteracions [10,121].

Per altra banda, recentment s'ha suggerit que la ingesta de sucres simples també podria estar associada amb la inducció d'alteracions de la funció vascular i la funció cognitiva [88,397]. A més, hi ha una creixent evidència de la necessitat d'estudiar els efectes de la ingesta crònica de sucres, ja que sovint els consumidors de grans quantitats de sucre, ho fan durant períodes prolongats [1].

En la present tesi s'identifiquen dianes moleculars responsables de les alteracions vasculars i metabòliques produïdes per la ingesta subcrònica (8 setmanes) de sucres simples en forma líquida en rates femella. També es mostra com afecta la prolongació de la ingesta fins a una suplementació crònica (28 setmanes) en alteracions prèviament observades, així com en la funció cognitiva. A més, es demostra que la ingesta de fructosa produeix efectes més severos que la glucosa, indicant que les alteracions produïdes no només depenen de la quantitat de calories que s'ingereixen sinó també del propi metabolisme de cada sucre.

## **1. Efectes de la ingesta subcrònica de sucres simples (20% p/v, 8 setmanes)**

### **1.1. Efectes en la regulació de l'homeòstasi energètica**

La suplementació de sucres simples en forma líquida durant 8 setmanes va comportar una manca de compensació calòrica, ja que es va produir un increment important de la ingesta de beguda i una reducció insuficient del consum de menjar. Aquest fet coincideix amb estudis previs realitzats en el nostre grup d'investigació [7,9,121], així com per altres autors [398,399].

No obstant, en aquest cas, el consum de beguda del grup glucosa va ser superior al del grup fructosa, fet que va induir una pitjor compensació i un augment de la ingesta calòrica total. En un estudi realitzat per Light i col. [400] en el que es comparen els efectes produïts per la ingesta de solucions de diferents sucres (glucosa, fructosa, sacarosa i HCFS) al 13% (p/v) en rates femella durant 8 setmanes, també observaren un increment del consum de la beguda edulcorada amb glucosa i com a conseqüència un augment del consum calòric total respecte els altres sucres. Tal i com suggereixen els autors, la divergència en el consum es podria deure al diferent poder edulcorant de cada sucre: un major poder edulcorant induiria probablement un menor consum de beguda.

La reducció del consum de menjar podria ser promoguda per l'increment dels nivells plasmàtics de leptina en els dos grups suplementats amb sucre, ja que aquesta hormona promou la sensació de sacietat [192]. A més, els seus nivells es correlacionen directament amb el nombre i la mida dels adipòcits [401], fet que coincideix amb l'increment del pes del teixit adipós observat en els grups glucosa i fructosa. Així mateix, l'expressió del gen que codifica per a aquesta hormona en el teixit adipós també presentà un augment en els dos grups que ingeriren sucres.

Una altre hormona important pel control de l'homeòstasi energètica és l'adiponectina. A diferència de la leptina, els seus nivells són inversament proporcionals a l'adipositat [228]. En aquest sentit, diversos estudis han observat una disminució de la seva concentració plasmàtica tant en pacients com en animals que presentaven obesitat [402,403]. En el present estudi, els nivells d'adiponectina en plasma no es modificaren en el grup fructosa però, en canvi, s'observà un fort increment en el grup glucosa, que també va ser corroborat amb l'expressió gènica en el teixit adipós. Aquests resultats contrasten amb la literatura descrita fins el moment [404], fet que mostra la necessitat d'elucidar el mecanisme pel qual la glucosa és capaç d'incrementar els nivells d'adiponectina.

Pel que fa a la insulina, de la mateixa manera que en estudis previs [8,121] la suplementació amb fructosa va produir hiperinsulinèmia. En el grup glucosa també s'observà un increment dels nivells plasmàtics d'insulina però aquest va ser menor que en el grup fructosa i no va

resultar significatiu. Una de les causes que podria explicar aquesta diferència és la hiperadiponectinèmia present en el grup glucosa, ja que aquesta hormona promou una millor sensibilitat a la insulina en els òrgans perifèrics [227]. No obstant, en calcular l'ISI, l'índex de sensibilitat a la insulina, ambdós grups van presentar una disminució respecte al grup control.

Donats aquests resultats, s'aprofundí en l'estudi de la via de senyalització de la insulina tant en el fetge com en l'aorta. S'observà que la ingesta dels dos sucres produïa una alteració en aquesta via, però que l'efecte era molt més intens en els animals del grup fructosa. De fet, s'obtingué que, en ambdós teixits, només els animals suplementats amb fructosa mostraven una reducció significativa de la fosforilació de la proteïna Akt. Aquests resultats coincideixen amb els observats prèviament en el nostre grup d'investigació [8], així com en un estudi intervencional realitzat en pacients amb sobrepès o obesitat que demostrà que la ingesta de fructosa, però no de glucosa, durant 10 setmanes en condicions isocalòriques reduïa la sensibilitat a la insulina [60]. A més, suggereixen l'existència d'un origen comú per a la disfunció metabòlica i vascular.

## **1.2. Efectes en el metabolisme de carbohidrats i lípids**

Està àmpliament descrit que un increment de la ingesta d'energia sense un augment de la despesa energètica comporta un increment de pes. D'aquesta manera, s'esperaria que en aquest estudi tant els animals del grup glucosa com del fructosa presentessin un augment del seu pes corporal. No obstant, només el grup fructosa mostrà un increment del pes dels animals al final de l'estudi, així com també del pes del fetge. De manera similar, únicament les rates suplementades amb fructosa van presentar hipertrigliceridèmia. Així, conjuntament, aquests resultats suggereixen l'existència de diferències en el metabolisme dels dos sucres.

Pel que fa al procés de lipogènesi hepàtica, aquest es va veure incrementat tant en el grup glucosa com en el grup fructosa, ja que es va observar una inducció de l'expressió d'enzims claus en el control de la síntesi d'àcids grassos com ara FAS i SCD1. Aquests enzims són controlats principalment per dos factors de transcripció, ChREBP i SREBP-1 [131]. L'expressió proteica de ChREBP no es va veure modificada però, en canvi, els nivells d'SREBP-1 es van veure incrementats únicament en el fetge de les rates del grup fructosa.

Aquests resultats coincideixen amb d'altres estudis, com per exemple el realitzat per Koo i col. [405] en el que observaren un increment d'SREBP-1 després de la ingesta d'una dieta sòlida amb un alt contingut de fructosa durant 2 setmanes. En canvi, difereixen dels prèviament obtinguts en el nostre grup d'investigació després d'una suplementació durant 2 setmanes [9] i 8 setmanes [7], en els quals es va observar que la ingesta de fructosa líquida produïa un increment de ChREBP, mentre que no modificava els nivells d'SREBP-1. Considerant que ChREBP és activat per intermediaris derivats del metabolisme dels

carbohidrats que provenen de la dieta [406], aquestes diferències es poden deure al fet que els animals del present estudi van romandre 12 h en dejú, mentre que els anteriorment descrits tan sols 2 h. Per altra banda, l'activació d'SREBP-1 és principalment induïda pels nivells d'insulina plasmàtica [407], fet que coincideix amb els resultats obtinguts en el present estudi, ja que únicament el grup fructosa va presentar hiperinsulinèmia.

Tot i que l'increment de la lipogènesi va ser més pronunciat en el grup fructosa que en el grup glucosa, la hipertrigliceridèmia observada no pot ser únicament explicada per l'augment de la síntesi d'àcids grassos, ja que aquest es va produir en ambdós grups suplementats amb sucre.

Respecte el catabolisme dels àcids grassos, la ingesta de fructosa líquida no va alterar els nivells de PPAR $\alpha$  en els extractes nuclears hepàtics ni l'expressió gènica dels gens diana *Cpt-1a* i *Aco*. En canvi, sí que s'observà una disminució significativa de l'expressió proteica de CPT-1A, fet que mostra que l'expressió d'mRNA i de proteïna no sempre es correlaciona. Tenint en compte que CPT-1A és un enzim limitant de la  $\beta$ -oxidació mitocondrial, aquests resultats suggereixen que la ingesta de fructosa podria induir una reducció d'aquest procés.

A diferència de la fructosa, la glucosa va produir un increment dels nivells de PPAR $\alpha$  en el teixit hepàtic. Donat que diversos autors demostren que l'adiponectina indueix l'expressió de PPAR $\alpha$  [246,408], la hiperadiponectinèmia present en el grup glucosa podria ser la responsable d'aquest augment dels nivells de PPAR $\alpha$ . No obstant, malgrat la inducció de PPAR $\alpha$  va correspondre amb un increment de l'expressió gènica de *Cpt-1a* i *Aco*, els nivells proteics de CPT-1A no es van veure modificats, suggerint que la  $\beta$ -oxidació no es va veure alterada en el grup glucosa.

Els efectes diferencials de fructosa i glucosa sobre CPT-1A semblen indicar que la ingesta d'ambdós sucres produeix per algun mecanisme desconegut, com podria ser una major degradació de la proteïna, una reducció dels nivells proteics de CPT-1A en el fetge. Tanmateix, aquest efecte és contrarestat en el grup glucosa per un increment en l'expressió gènica de *Cpt-1a*, probablement a través d'un increment dels nivells de PPAR $\alpha$  induït per la hiperadiponectinèmia, de forma que finalment els nivells de proteïna no resulten reduïts.

Per altra banda, un augment de la secreció de lipoproteïnes sintetitzades en el fetge també pot promoure un increment dels triglicèrids plasmàtics. Així, s'observà que únicament els animals del grup fructosa presentaren un augment dels nivells hepàtics de la proteïna MTP, la qual és essencial per a la incorporació de triglicèrids en les VLDL i per a la seva posterior secreció [137,143]. Aquest efecte coincideix amb l'observat per Taghibiglou i col. [409] en estudis realitzats en hámsters que van mantenir una dieta rica en fructosa (60%) durant 2 setmanes.

En conjunt, els resultats obtinguts demostren que la ingesta de fructosa, però no de glucosa, en forma líquida durant 8 setmanes en rates femella produeix una hipertrigliceridèmia, com a conseqüència d'un increment de la lipogènesi hepàtica i d'una

reducció del catabolisme dels àcids grassos, corroborant així els resultats obtinguts en estudis previs [7,9,10]. En el present estudi, a més, s'observa que la hipertrigliceridèmia en el grup fructosa també podria ser promoguda per un increment de la secreció de lipoproteïnes VLDL.

### 1.3. Efectes en la reactivitat vascular

La ingesta de fructosa líquida durant 8 setmanes va induir una disminució de l'EIDV, valorat a través de les respostes a SNP. Pel que fa a l'EDV, es va observar una lleugera disminució de la relaxació induïda per BK, mentre que no es detectaren alteracions en les respostes a Ach.

Aquests resultats contrasten amb altres estudis [88,410] en els que s'obtingué que la ingesta d'HFCS al 20% en rates mascles durant 10 setmanes produí una disminució de la resposta a Ach, mentre que no alterà la relaxació induïda per SNP. No obstant, aquestes variacions en els resultats es poden atribuir a les diferències en el tipus de sucre i el sexe dels animals utilitzats.

Pel que fa a la resposta contràctil, la fructosa no va produir alteracions en la vasoconstricció induïda per PE, ni en l'expressió gènica de receptors  $\alpha$ -adrenèrgics o de l'angiotensina. Tot i que en alguns estudis [411] s'ha reportat que la ingesta de fructosa indueix un increment de la resposta a PE, els nostres resultats coincideixen amb d'altres en els que no s'han observat diferències en la resposta contràctil a PE en les artèries mesentèriques [412], ni en l'aorta [413] d'animals suplementats amb fructosa.

Pel contrari, la ingesta de glucosa no només no va produir una reducció de la resposta vasodilatadora sinó que la va potenciar. Així, va incrementar l'EIDV, observada a través de les corbes concentració-resposta a SNP. No obstant, de manera similar a la fructosa, la glucosa no va modificar l'EDV.

En aquest mateix sentit, les rates suplementades amb glucosa van mostrar una disminució de la resposta contràctil a PE, coincidint així amb l'increment de la relaxació observada. A través de la comparació de les respostes contràctils a PE abans i després de l'administració d'L-NAME, un inhibidor de l'enzim NOS, es va poder comprovar que aquest increment de la relaxació induït per la ingesta de glucosa era degut a una augment de l'NO basal. Aquest increment sembla ser degut a una major producció d'NO, induïda per l'increment de la fosforilació d'eNOS observat en les aortes dels animals del grup glucosa.

Estudis en models animals i en humans han demostrat l'associació entre els nivells d'adiponectina circulant i la funció endotelial [414,415]. De fet, s'ha comprovat que l'adiponectina estimula la síntesi d'NO en les cèl·lules endotelials a través de la fosforilació d'eNOS en la posició Ser<sup>1177</sup> [285,416]. Així, en conjunt, aquests resultats emfatitzen de nou la importància de la hiperadiponectinèmia present en el grup glucosa, ja que l'increment

de l'NO basal produït per la ingesta de glucosa líquida es podria atribuir principalment a l'augment dels nivells d'aquesta hormona en plasma. A més, un estudi clínic [417] va concloure que l'associació de l'adiponectina amb la funció vascular era independent de la sensibilitat a la insulina, fet que coincideix amb els resultats del present estudi.

Per altra banda, és important considerar que tot i les diferències observades entre la ingesta de glucosa i fructosa líquida en l'EIDV, la suplementació d'ambdós sucres va preservar l'EDV. Aquests resultats, aparentment sorprenents, també han sigut observats en d'altres estudis. Així, Mourmoura i col. [418] van demostrar que rates amb diabetis tipus 2 no presentaven cap alteració en l'EDV d'artèries coronàries, mentre que la resposta a un donador d'NO va ser fins i tot incrementada. També, en l'estudi clínic citat anteriorment [417] es va observar que els nivells d'adiponectina es correlacionaven positivament amb la vasodilatació arterial en resposta a NO (EIDV), però no amb l'EDV. Així mateix, alguns estudis tampoc han observat canvis en l'EDV induïts per la ingesta de fructosa [412,413].

En general, l'NO s'ha considerat el principal promotor de l'EDV i sovint la seva alteració s'ha associat amb una reducció de la biodisponibilitat d'NO. No obstant, altres substàncies com PGI<sub>2</sub> i EDHF també són importants reguladors de la vasodilatació [75]. Així, per una banda, s'ha descrit que l'NO pot regular negativament la síntesi d'EDHF [419]; mentre que per l'altra, s'ha observat que en artèries de rates diabètiques una reducció de la vasorelaxació induïda per NO pot ser compensada per un increment d'EDHF [420]. En conjunt, aquests estudis demostren l'existència d'un efecte compensatori entre diferents vies que indueixen a la relaxació i suggereixen la presència d'altres molècules diferents d'NO involucrades en la relaxació a Ach. Aquest fet explicaria en part perquè tot i observar alteracions en les respostes a SNP, les respostes a Ach estan preservades.

En aprofundir en l'estudi de les vies moleculars relacionades amb la relaxació vascular, s'observà que la ingesta de fructosa, però no la de glucosa, induïa a una disminució de l'expressió gènica d'Ac6 i de la fosforilació de la proteïna PKA, indicant una possible reducció dels nivells de cAMP. Donat que PGI<sub>2</sub> pot incrementar els nivells de cAMP, els nostres resultats suggereixen que la preservació de les respostes a Ach en els animals del grup fructosa probablement és deguda a un increment d'EDHF i no de PGI<sub>2</sub>. A més, l'anàlisi de l'expressió gènica de l'enzim PGIS, així com de COX1 i COX2 no va mostrar diferències entre els grups.

Per altra banda, l'augment de l'expressió gènica i proteica de PDE4 observat en el grup fructosa potenciaria aquesta reducció dels nivells de cAMP, fet que podria específicament dificultar la fosforilació de la proteïna VASP en la posició Ser<sup>157</sup>. Així, la reducció de p-VASP (Ser<sup>157</sup>) combinada amb la reducció de l'expressió proteica de VASP en les aortes de les rates suplementades amb fructosa podria ser la responsable de l'alteració de la relaxació independent d'NO.



Un altre mecanisme que pot induir la disfunció endotelial és la inactivació d'NO, ja que pot promoure una disminució de la biodisponibilitat d'NO. Està descrit que un increment de la producció de ROS i específicament d'anions superòxid pot ser-ne la causa [278]. No obstant, en el present estudi, en mesurar l'expressió gènica de les principals subunitats de l'enzim NOX expressades en aorta (Nox1 i Nox4) [421], no es van observar diferències significatives entre els grups.

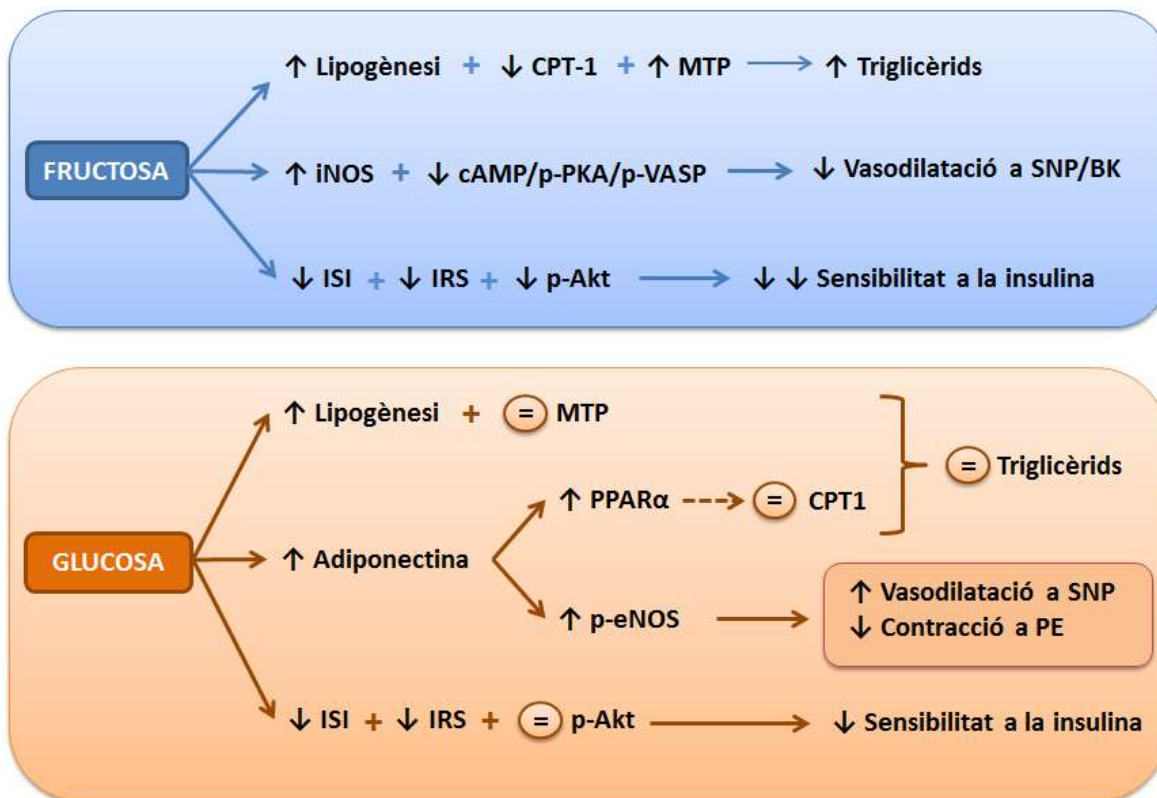
També, s'ha demostrat que en condicions d'estrès metabòlic s'estimula l'enzim iNOS que pot produir una gran quantitat d'NO i induir la producció de ROS [298]. Malgrat en aquest estudi no es va mesurar la quantitat de ROS o la disponibilitat d'NO, s'observà un increment dels nivells proteics d'iNOS únicament en les aortes dels animals del grup fructosa.

Així, la reducció de la relaxació en resposta a SNP observada en el grup fructosa podria ser deguda conjuntament a la inducció de l'enzim iNOS i a la disminució de la relaxació dependent de cAMP.

Pel que fa al grup glucosa, tot i presentar un increment de les respostes dels anells aòrtics a SNP, s'observà una reducció de la fosforilació de VASP en la posició Ser<sup>239</sup>, suggerint que la fosforilació de VASP i probablement la relaxació dependent de cGMP no és el mecanisme pel qual la ingesta de glucosa potencia la relaxació en resposta a SNP. En aquest mateix sentit, Aszódi i col. [422] van observar que en anells aòrtics de ratolins deficientes de VASP la relaxació es preservava després de ser exposades a cGMP i cAMP, demostrant que VASP no és essencial per la regulació del to del múscul llis vascular. A més, Yousif i col. [423] van descriure que SNP induïa respostes vasodilatadores independents de cGMP en vasos sanguinis d'ovaris de conills.

Globalment, aquests resultats evidencien la necessitat de continuar investigant per tal d'elucidar els mecanismes per els quals la ingesta de glucosa i fructosa difereixen en la inducció d'efectes en la vasodilatació vascular i en concret en les vies de relaxació NO/cGMP/PKG i cAMP/PKA. Així, per exemple, estudis *in vitro* que valoressin les respostes vasodilatadores en presència d'inhibidors i activadors dels enzims GC, PKG i PKA permetrien una millor comprensió d'aquests efectes.

Finalment, a mode de resum, els resultats d'aquest estudi demostren que tot i que les rates suplementades amb glucosa van presentar un increment calòric superior, la ingesta de fructosa líquida en rates femella durant 8 setmanes causa alteracions metabòliques i vasculars més severes que la ingesta de glucosa. En la Figura VI-1 s'il·lustren els mecanismes suggerits.



**Figura VI-1.** Esquema dels mecanismes involucrats en els efectes causats per la ingesta de fructosa i glucosa. La hipertrigliceridèmia observada en el grup fructosa podria ser conseqüència de l'increment de la lipogènesi i de l'exportació d'àcids grassos en el plasma (MTP) combinat amb la reducció del catabolisme d'àcids grassos (CPT-1). L'increment d'iNOS juntament amb la reducció de la relaxació dependent de la via cAMP/PKA/p-VASP podria ser la responsable de la disminució de la vasodilatació de l'artèria aorta observada en resposta a BK i a SNP en el grup fructosa. A més, la ingesta de fructosa produeix una disminució de la sensibilitat a la insulina. Per altra banda, es postula que la hiperadiponectinèmia present en el grup glucosa podria compensar algunes d'aquestes alteracions a través de l'activació de PPARα i d'eNOS.

## 2. Efectes de la ingesta crònica de sucres simples (10% p/v, 28 setmanes)

### 2.1. Efectes en la regulació de l'homeòstasi energètica

De manera similar a l'estudi 1, la suplementació de sucres simples durant 28 setmanes a rates femella va produir un augment del consum de beguda, que degut a una falta de compensació calòrica va induir un increment de la ingesta calòrica total. No obstant, en aquest estudi la ingesta dels animals del grup glucosa i del fructosa va ser isocalòrica, de manera que els efectes diferencials que pugui ocasionar el consum de cadascun dels sucres estudiats no seran deguts merament a l'increment calòric sinó al metabolisme intrínsec de cada sucre.

La hiperleptinèmia present en el grup fructosa no va ser suficient per compensar l'increment de l'energia calòrica, suggerint un estat de resistència a la leptina. En canvi, en el grup glucosa, no es va observar un augment significatiu dels nivells plasmàtics de leptina. Considerant que la leptina és proporcional amb l'adipositat, aquests resultats coincideixen amb l'increment de pes del teixit adipós observat únicament en el grup fructosa. No obstant, sorprenentment, l'expressió gènica de la leptina en el teixit adipós va disminuir en els dos grups. Això es podria deure a un mecanisme de compensació que promogué la reducció de la síntesi de leptina en el teixit adipós amb l'objectiu de revertir la resistència a la leptina i així millorar la seva sensibilitat.

Un dels mecanismes responsables de la resistència a la leptina és una deficiència de la seva senyalització en l'hipotàlem, lloc principal d'actuació. D'aquesta manera, una disminució dels seus receptors o una insuficient activació de la seva via de senyalització pot comportar una alteració en l'alliberació de neuropèptids [213]. En aquest sentit, tant la ingesta de glucosa com de fructosa produïren una disminució de l'expressió gènica de *Lepr* així com un increment del neuropèptid orexigènic *AgRP*. A més, s'observà un augment de *Socs3*, una proteïna que actua com a reguladora negativa de la senyalització de la leptina, en els dos grups. Així, en conjunt, aquests resultats evidencien que tant la ingesta de glucosa com de fructosa induïren a una resistència a la leptina.

La leptina travessa la BBB mitjançant un procés d'endocitosi facilitada per receptor. Alguns estudis indiquen que aquest receptor és saturable ja que la captació de leptina per part del cervell no és proporcional als seus nivells plasmàtics [213,379]. A més, alts nivells de triglicèrids poden dificultar el pas de la leptina a través de la BBB i per tant disminuir la quantitat de leptina que arriba al cervell i més concretament a l'hipotàlem [190,214]. Així, aquests mecanismes podrien ser els responsables de l'aparició de hiperleptinèmia en el grup fructosa però no en el grup glucosa.

Per altra banda, coincidint amb l'estudi 1, els nivells d'adiponectina en plasma es van veure augmentats únicament en el grup glucosa. Nombrosos estudis han demostrat que

l'adiponectina activa diferents vies de senyalització principalment a través de la fosforilació de la proteïna AMPK [225]. Així, considerant que només el grup glucosa va presentar un increment en l'activació de la proteïna AMPK en el fetge, es demostra un augment de la transducció de la senyalització de l'adiponectina en aquest grup. D'aquesta manera, de nou, es posa de manifest la necessitat d'investigar els mecanismes pels quals la glucosa indueix un increment dels nivells d'aquesta hormona.

Pel que fa a la insulina, només la ingesta de fructosa va incrementar significativament la seva concentració plasmàtica. No obstant, els nivells de glucosa plasmàtica no es van modificar, fet que suggereix que la fructosa probablement promou una hiperinsulinèmia compensatòria per tal de normalitzar els nivells de glucosa circulant. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en el test GTT, ja que s'obtingué un increment de l'AUC de l'insulina mentre que, malgrat en l'últim temps d'estudi del TTG s'observà un increment de la concentració de glucosa plasmàtica, no es va produir un augment significatiu de l'AUC de glucosa.

En models animals, dietes sòlides riques en fructosa (50-60%) indueixen un estat pronunciat de resistència a la insulina. De fet, aquestes condicions han estat àmpliament utilitzades com a model de resistència a la insulina [424–426]. En estudis previs realitzats al nostre grup d'investigació es demostrà que la ingesta de fructosa líquida al 10% durant 2 i 8 setmanes també induïa una resistència a la insulina, produïda principalment per un dèficit de la senyalització hepàtica de la insulina [8,121]. Igualment, en l'estudi 1 presentat en aquesta tesi també s'observen aquestes alteracions.

En el present estudi, tal i com es detallarà més endavant, s'observà que la ingesta de fructosa durant un període crònic produïa una alteració de la senyalització de la insulina en el teixit adipós i en el còrtex. No obstant, en el fetge, malgrat el grup fructosa presentà una lleugera disminució en els nivells proteics d'IRS-2, no s'observà una reducció de la fosforilació de la proteïna Akt. Tot i això, cal tenir present que malgrat la suplementació de fructosa a llarg termini no evidencià el desenvolupament d'una clara resistència a la insulina a nivell hepàtic, sí que produí una certa pèrdua de la sensibilitat a aquesta hormona. Així, considerant l'increment dels nivells plasmàtics d'insulina, s'esperaria un augment de la seva via de senyalització. En canvi, en el grup fructosa no s'observà una activació de la via PI3K/Akt, sinó tot el contrari. Aquest fet queda reflectit en el càlcul de la fosforilació d'Akt en funció dels nivells d'insulina plasmàtica, on s'observa una disminució en el grup fructosa.

A més, habitualment el consum de grans quantitats de sucres en forma líquida no es realitza de manera aïllada, sinó combinada amb la ingesta d'una dieta rica en sucres i greixos. En aquest sentit, estudis realitzats en el nostre grup d'investigació van demostrar que ratolins alimentats amb una dieta *Western* i un 15% de fructosa en l'aigua de beguda produïen una hiperinsulinèmia així com una reducció de l'ISI, mentre que, tot i presentar la mateixa ingesta calòrica, ratolins alimentats només amb la dieta *Western* no produïen

aquestes alteracions [427]. Aquests resultats demostren que específicament la ingesta de fructosa potencia el desenvolupament de la resistència a la insulina quan és consumida juntament amb dieta rica en greixos i sucres.

Pel que fa a la ingesta de glucosa, la seva suplementació no només no va produir una disminució en la senyalització de la insulina, sinó que va induir una activació de la via PI3K/Akt, observada a través d'un increment de la fosforilació de la proteïna Akt. L'adiponectina és una citocina que promou la sensibilització a la insulina, ja que afavoreix la captació de glucosa i disminueix la gluconeogènesi [225,227]. Per tant, la hiperadiponectinèmia present en el grup glucosa podria ser la responsable d'aquest increment de l'activitat d'Akt.

Per altra banda, una de les característiques de la resistència a la insulina és l'increment de la gluconeogènesi hepàtica [173]. No obstant, en el present estudi ambdós grups suplementats amb sucre van mostrar un increment de la fosforilació de FoxO1 que comportà la inactivació d'aquest factor de transcripció i, com a conseqüència, una disminució dels gens que controlen la gluconeogènesi (G6P, PEPCK). Tot i així, aquests resultats coincideixen amb els obtinguts després d'una administració de fructosa durant 2 i 8 setmanes [8,121], fet que ens va portar a intentar elucidar els mecanismes responsables d'aquest fenomen.

Està àmpliament descrit que l'activació de la via PI3K/Akt promou la fosforilació de FoxO1 i com a conseqüència la inhibició de la gluconeogènesi [173], així com també hi ha evidències que indiquen que l'adiponectina promou la inhibició de la producció de glucosa a través de la reducció de l'expressió dels enzims G6P i PEPCK [225,237]. Considerant els resultats obtinguts, aquests dos mecanismes podrien explicar la disminució de la gluconeogènesi observada en el grup glucosa, però no en el grup fructosa.

També s'ha descrit que proteïnes com CREB, HNF4, PGC-1 $\alpha$  i SIRT1 poden modular l'activitat de FoxO1 [127]. No obstant, cap d'elles va resultar modificada en els grups suplementats amb sucre, descartant-les com a responsables de la inhibició de la gluconeogènesi.

mTOR, juntament amb AMPK, és una proteïna important en la regulació de l'homeòstasi energètica. És activada en condicions riques en nutrients, així com a través de la insulina [428]. En el present estudi, la ingesta de glucosa i la de fructosa van induir l'activació d'mTOR en el fetge, fet que es podria associar amb l'increment de la ingesta calòrica ingerida en ambdós grups. No obstant, aquest increment resultà superior en el grup fructosa respecte el grup glucosa. Considerant que les dietes d'ambdós grups van ser isocalòriques, s'evidencia la importància de la hiperinsulinèmia present en el grup fructosa en la seva activació. A més, un altre mecanisme que podria explicar aquesta menor activació d'mTOR en el grup glucosa és la hiperadiponectinèmia i la consegüent activació

d'AMPK, ja que s'ha observat que aquesta podria contrarestar l'activació d'mTOR [429,430].

Diversos estudis assenyalen la importància d'mTOR en la regulació del procés de la gluconeogènesi. Per exemple, Yue i col. [431] van demostrar que la proteïna mTOR era capaç de fosforilar i inactivar FoxO1 en mostres d'hipocamp de ratolí. En aquest mateix sentit, Houde i col. [178] van descriure que rates tractades amb rapamicina, un inhibidor d'mTOR, presentaven en el fetge una activació de FoxO1, així com un increment dels enzims claus per la gluconeogènesi, G6P i PEPCK. A més, per tal de confirmar aquests resultats, en aquest mateix estudi es va observar que cèl·lules hepàtiques tractades amb rapamicina durant 24 h presentaven un increment de la producció de glucosa. Així, aquests estudis suggereixen que l'activació de la proteïna mTOR observada en els grups glucosa i fructosa podria ser la responsable de la inactivació de FoxO1 i de la consegüent disminució de la gluconeogènesi hepàtica.

També, s'ha observat que l'activació prolongada d'mTOR promou la resistència a la insulina, a través de l'increment de la fosforilació d'IRS en posició serina i de la degradació proteosomal d'IRS [177,432]. Així, coincidint amb estudis previs [121], el descens de l'expressió hepàtica d'IRS-2 en el grup fructosa es podria atribuir a un augment de l'activació d'mTOR.

Per altra banda, cal considerar que el fet que l'expressió dels gens gluconeogènics estigui disminuïda, suggereix que la resistència a la insulina en el present estudi no és deguda a un increment de la producció hepàtica de glucosa sinó a una manca de captació de la glucosa així com a una disminució de la resposta a la insulina per part dels teixits perifèrics. En aquest sentit, diversos estudis demostren que rates suplementades amb fructosa presenten una disminució del receptor GLUT4 a la membrana de les cèl·lules del múscul esquelètic [8,433].

Així doncs, pel que fa a la resistència a la insulina, no es compleix la hipòtesi inicialment proposada que una prolongació de la ingesta de fructosa empitjoraria les alteracions prèviament detectades. En aquest sentit, s'esperaria que la suplementació de fructosa durant 28 setmanes induís a una disminució considerable dels nivells hepàtics d'IRS-2 que, al seu torn, impedís la fosforilació i la consegüent activació d'Akt. A més, aquesta inhibició d'Akt promouria un augment de la gluconeogènesi hepàtica. No obstant, en el present estudi s'ha observat tan sols una lleugera disminució dels nivells d'IRS-2 i fins i tot una reducció de la gluconeogènesi hepàtica, suggerint que a llarg termini la ingesta de fructosa desenvolupa mecanismes que permeten atenuar la resistència hepàtica a la insulina observada després de períodes aguts o subcrònics.

### **2.2. Efectes en el metabolisme de carbohidrats i lípids**

La metabolització hepàtica de la glucosa i la fructosa difereixen especialment en les primeres reaccions enzimàtiques. Així, mentre la glucosa entra a la via glucolítica a través

de l'enzim GK, la fructosa ho fa mitjançant la FK [17,45]. En aquest sentit, s'obtingué que la ingesta de glucosa i la de fructosa líquida durant 28 setmanes induí l'expressió hepàtica dels enzims GK i FK, respectivament. D'una banda, aquesta observació corrobora les diferències descrites sobre el metabolisme de cada sucre; de l'altra, demostra que la ingesta d'altres quantitats de sucres induïx el seu metabolisme a nivell hepàtic.

Diversos estudis han analitzat com la inducció de l'enzim FK contribueix a les alteracions hepàtiques produïdes per la ingesta de fructosa. Així, per exemple, Ishimoto i col. [434] van demostrar que ratolins deficients de FK estaven protegits de les alteracions metabòliques induïdes pel consum de fructosa observades en animals *wildtype*. Pel contrari, hi ha menys literatura que descriu la regulació nutricional de l'expressió de GK [435]. No obstant, aquests resultats mostren que malgrat la glucosa, a diferència de la fructosa, es metabolitza per diversos òrgans extrahepàtics, en condicions d'excés energètic, la glucosa no només pot ser metabolitzada pel fetge sinó que també pot induir canvis en l'expressió hepàtica dels enzims que la metabolitzen.

Una altra característica pròpia del metabolisme de la fructosa és l'elevat consum d'ATP. Com a conseqüència, augmenten els nivells d'AMP que induïxen la producció d'àcid úric [17,44]. En el present estudi, s'ha observat que únicament el consum de fructosa produeix hiperuricèmia, corroborant les diferències en el metabolisme de la glucosa i la fructosa. A més, tal i com s'indica en nombrosos estudis, aquest increment de l'àcid úric pot promoure el desenvolupament d'alteracions cardiovasculars [42,85]. Cal destacar que els rosegadors, a diferència dels humans, disposen de l'enzim uricasa que degrada l'àcid úric a al·lantoïna i per tant redueix els nivells d'àcid úric [11]. De fet, s'ha demostrat que quan s'inhibeix l'uricasa en rates, la ingesta de fructosa incrementa 5 vegades les concentracions d'àcid úric en plasma [436]. Així doncs, en humans aquesta alteració podria estar fins i tot agreujada.

Considerant que els animals dels dos grups suplementats amb sucres simples presenten la mateixa ingesta d'energia i que, tal i com s'ha comprovat, ambdós són metabolitzats pel fetge, seria lògic esperar que produïssin unes alteracions metabòliques semblants. No obstant, de nou, s'observa que només la fructosa produeix hipertrigliceridèmia. A més, en el present estudi, es va obtenir un increment dels nivells de triglicèrids plasmàtics tant en dejú com en un estat postprandial. Així, aquests resultats suggereixen una activació de la lipogènesi. En aquest sentit, Crescenzo i col. [437] van observar un increment de la lipogènesi hepàtica *de novo* en rates mascles alimentades amb una dieta sòlida rica en fructosa (30%) durant 8 setmanes.

En valorar l'expressió proteica dels principals enzims involucrats en la lipogènesi, s'observà que no només la fructosa sinó també la glucosa produïa una activació d'aquest procés, ja que ambdós grups mostraven un increment dels nivells de FAS en el fetge. Pel que fa a SCD1, tot i que s'obtingué un lleuger increment de la seva expressió en el grup fructosa, aquest no resultà significatiu. Això es podria deure a la diferent vida mitja d'aquests enzims,

ja que la d'SCD1 és de tan sols 3-5 h [438], mentre que la de FAS és aproximadament de 15 h [439]. Així, les 12 h de dejú establertes en aquest estudi podrien influenciar en la detecció de la inducció d'aquests enzims.

A més, en el grup fructosa, de la mateixa manera que en l'estudi 1 però a diferència d'estudis previs [7,9], s'observà un increment d'SREBP-1 però no de ChREBP. Considerant que en aquest estudi els animals també van romandre 12 h en dejú, es corrobora la hipòtesi que la diferència d'hores de dejú influeixen en el nivell d'expressió d'aquests factors de transcripció.

Tal i com s'ha comentat prèviament, SREBP-1 és activat pels nivells plasmàtics d'insulina i per tant l'increment de la seva expressió es podria associar amb la hiperinsulinèmia present en el grup fructosa. No obstant, també s'ha descrit que mTOR podria regular positivament l'activació d'SREBP-1 [181,440]. En aquest sentit, tant ratolins com cèl·lules hepàtiques tractades amb rapamicina van mostrar una reducció dels nivells d'SREBP-1 i de l'expressió de gens implicats en la lipogènesi [441].

Aparentment, mTOR pot controlar l'activació d'SREBP-1 mitjançant diferents mecanismes. En primer lloc, s'ha descrit que mTOR indueix l'expressió gènica d'SREBP-1 així com la seva traducció, probablement a través de l'activació d'S6K (*S6 kinase*) [430,442]. En segon lloc, mTOR podria promoure la lipogènesi a través de l'activació de la resposta UPR. Així, s'ha observat que la inducció de l'estrès d'ER promou el processament necessari per l'activació d'SREBP [258,443]. Finalment, mTOR promou la localització nuclear d'SREBP-1 a través d'un mecanisme que involucra Lipina-1, una proteïna que impedeix la unió d'SREBP-1 amb els seus gens diana. L'activació d'mTOR promou la fosforilació de Lipina-1, fet que indueix la seva exclusió del nucli i, com a conseqüència, l'activació d'SREBP-1 [182]. Així doncs, a través dels mecanismes descrits, mTOR podria controlar la transcripció, el processament i la localització nuclear d'SREBP-1.

També, s'ha descrit que tant l'adiponectina com l'AMPK poden inhibir el processament proteolític d'SREBP-1 així com la seva translocació al nucli [238,444]. D'aquesta manera, considerant, per una banda, la hiperadiponectinèmia i l'increment de l'activació d'AMPK en el grup glucosa, i per l'altra, la hiperinsulinèmia i l'augment més pronunciat de la fosforilació d'mTOR en el grup fructosa, aquests mecanismes podrien explicar l'increment d'SREBP-1 observat en els extractes nuclears hepàtics del grup fructosa i no del grup glucosa.

Per altra banda, s'ha reportat que dietes riques en carbohidrats promouen l'activació d'mTOR, la qual indueix la via IRE1/XBP1 de la resposta UPR, que al seu torn, promou l'expressió de gens lipogènics [445]. Aquests resultats coincideixen amb els de Lee i col. [254] els qual demostren que XBP1 regula l'expressió de gens lipogènics de manera independent d'SREBP-1 i ChREBP. Així, l'activació d'mTOR/IRE/XBP1 també podria ser la



responsable, en part, de l'increment del procés de la lipogènesi observat en els dos grups suplementats amb sucres.

Pel que fa al catabolisme dels àcids grassos, la ingesta dels dos sucres va produir una reducció de la  $\beta$ -oxidació hepàtica. Aquest fet podria estar relacionat amb l'increment de la lipogènesi observat en ambdós grups suplementats amb sucre, ja que un augment de l'activitat d'ACC indueix la producció de malonil-CoA, el qual impedeix l'entrada d'àcids grassos a l'interior del mitocondri i, com a conseqüència, inhibeix alostèricament l'enzim CPT-1 [148].

Per altra banda, PPAR $\alpha$  és un dels principals reguladors de la  $\beta$ -oxidació tant mitocondrial com peroxisòmica. De fet, estudis previs van demostrar que la ingesta de fructosa líquida durant 14 dies produïa una reducció de la  $\beta$ -oxidació degut a una disminució dels nivells hepàtics de PPAR $\alpha$ , així com dels seus gens diana *Cpt-1a* i *Aco* [9,10]. No obstant, en el present estudi, no s'observà una disminució significativa de l'expressió gènica i proteica de PPAR $\alpha$  en els grups suplementats amb sucre, fet que assenyala que els nivells de PPAR $\alpha$  no són els únics responsables de la reducció del catabolisme dels àcids grassos. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en l'estudi realitzat per Baena i col. [7] en el que la ingesta de fructosa líquida durant 8 setmanes produí una disminució de l'activitat de la  $\beta$ -oxidació hepàtica, però no alterà els nivells de PPAR $\alpha$ . A més, en cap dels dos grups suplementats amb sucre, tampoc s'observà una reducció de l'expressió de SIRT1, NAMPT o PGC-1 $\alpha$ , proteïnes reguladores de l'expressió de PPAR $\alpha$ .

El sensor energètic mTOR, de nou, podria tenir un paper important. Recentment, s'ha suggerit que la seva activació podria inhibir l'activitat de PPAR $\alpha$ , a través d'nCOR1 (*nuclear receptor corepressor 1*), un regulador transcripcional que s'uneix a diferents receptors nuclears, silenciant la seva activitat [430,446]. Així, l'increment de p-mTOR podria promoure l'acumulació nuclear d'nCOR1, el qual interaccionaria amb PPAR $\alpha$ , inhibint la seva activitat transcripcional. D'altra banda, s'ha demostrat que, en el nucli de les cèl·lules hepàtiques, Lipina-1 activa l'expressió de diferents gens involucrats en la  $\beta$ -oxidació, ja sigui a través de l'activació de PPAR $\alpha$  o bé mitjançant la inducció de la interacció entre PPAR $\alpha$  i PGC-1 $\alpha$  [447]. Tal i com s'ha mencionat anteriorment, mTOR pot contribuir a la disminució dels nivells de Lipina-1 en el nucli, fet que també contribuiria a la reducció de l'activitat de PPAR $\alpha$ . Considerant aquests mecanismes, l'increment d'mTOR observat en els grups suplementats amb sucre podria promoure una reducció de l'activitat de PPAR $\alpha$ , inhibint així la  $\beta$ -oxidació hepàtica.

En aquest sentit, en el present estudi es va observar una clara reducció de l'expressió gènica i proteica de CPT-1A en els dos grups que ingeriren sucre en forma líquida. Considerant que l'expressió de CPT-1A està controlada principalment per l'activitat transcripcional de PPAR $\alpha$  i que aquest és un enzim limitant de la  $\beta$ -oxidació mitocondrial, aquest resultat confirma la disminució de l'activitat de la  $\beta$ -oxidació observada en el grup glucosa i fructosa. No obstant, l'expressió d'*Aco*, un altre gen diana de PPAR $\alpha$  no es va veure modificada per

la ingesta de sucres. Aquest fet es podria deure a una diferent especificitat de PPAR $\alpha$  per induir l'expressió d'*Aco* i de *Cpt-1a* o bé, tal i com suggereixen alguns autors [148,448], a l'existència de mecanismes independents de PPAR $\alpha$  que regulen específicament CPT-1A.

En resum, s'observa que la ingesta de sucres en forma líquida durant 28 setmanes produeix un increment de la lipogènesi i una reducció del catabolisme dels àcids grassos. No obstant, aquests no poden ser els únics mecanismes responsables de la hipertrigliceridèmia observada en el grup fructosa, ja que aquestes alteracions també van ser presents en el grup glucosa.

La hipertrigliceridèmia també s'ha associat amb un increment de la secreció de VLDL del fetge a la circulació sanguínia [135]. En el present estudi, tot i que no s'observà cap alteració en l'expressió d'MTP, una proteïna necessària per la secreció de lipoproteïnes, sí que es detectà, únicament en el fetge de les rates suplementades amb fructosa, un increment de l'expressió gènica d'Apo C-III, una apolipoproteïna que, entre d'altres funcions, promou la secreció de VLDL [449].

De fet, diversos estudis han correlacionat l'augment dels nivells d'Apo C-III amb la hipertrigliceridèmia tant en animals com en humans [450,451]. Així, per exemple, s'ha demostrat que la deficiència d'*ApoCIII* indueix una reducció dels nivells de triglicèrids en plasma, mentre que la seva sobreexpressió promou la hipertrigliceridèmia [452,453]. En aquest sentit, Apo C-III està emergint com una possible nova diana terapèutica per controlar el risc a patir malalties cardiovasculars [454].

A més, Apo C-III també inhibeix l'enzim LPL així com la interacció de les lipoproteïnes amb els seus receptors [137,454]. En aquest sentit, en el present estudi, s'ha observat que en els animals del grup fructosa l'expressió d'LPL estava reduïda significativament tant en el teixit adipós com en el múscul, fet que suggereix una reducció de la captació de VLDL per part dels teixits perifèrics. Aquest resultat coincideix amb els obtinguts per Rodrigues i col. [455], els quals mostren que la suplementació d'una dieta rica en fructosa (60%) durant 8 setmanes en rates produeix una disminució de l'activitat de l'LPL en el teixit adipós.

Recentment, Uno i col. [456] van demostrar que l'activació d'mTOR en el fetge promouia un increment dels nivells de triglicèrids en plasma, mentre que reduïa l'expressió d'LPL en el teixit adipós a través d'una via de senyalització neuronal. Així, considerant que el grup fructosa presenta un increment superior de l'activació d'mTOR en el fetge, aquest podria ser un altre mecanisme que explicaria la disminució de la captació de triglicèrids plasmàtics.

En la mateixa línia, l'expressió de VLDLR es va veure disminuïda en el teixit adipós i en el múscul, tot i que la reducció només resultà significativa en el múscul. A més, en el cas del teixit adipós, s'obtingué que únicament els animals del grup fructosa presentaven una disminució de CD36, un transportador que facilita l'entrada d'àcids grassos a la cèl·lula. En conjunt, tots aquests resultats evidencien que la ingesta de fructosa promou una disminució de la captació de VLDL en els teixits perifèrics.

Per altra banda, l'aclariment de lipoproteïnes residuals per part del fetge és un altre procés que també contribueix de manera important en la regulació dels nivells de triglicèrids en plasma. Aquest es duu a terme principalment a través dels receptors LDLR, LRP i VLDLR [139]. La suplementació de sucres en forma líquida durant 28 setmanes no va alterar els nivells hepàtics d'LDLR ni tampoc els de PCSK9, una proteïna que promou la degradació d'aquest receptor. No obstant, sí que s'observà una disminució de l'expressió gènica d'LRP només en el grup fructosa.

Pel que fa als nivells de VLDLR, s'obtingué que els dos grups suplementats amb sucres presentaven una disminució de l'expressió gènica i proteica de VLDLR, suggerint que la ingesta de sucres redueix la captació de lipoproteïnes riques en triglicèrids. En aquest sentit, s'ha observat que la suplementació de dietes riques en greixos i sucres en ratolins deficientes de *Vldlr* produeix un increment dels nivells de triglicèrids en sang [142]. Per altra banda, Gao i col. [457] van descriure que l'activació hepàtica de PPAR $\alpha$  incrementava la transcripció de *Vldlr*. Així, la disminució de l'activitat de PPAR $\alpha$ , descrita anteriorment, podria ser un dels mecanismes promotors de la reducció de l'expressió hepàtica de VLDLR.

Tenint en compte tots aquests resultats, malgrat ambdós grups suplementats amb sucre presenten alteracions en l'aclariment de lipoproteïnes, la ingesta de fructosa líquida condueix clarament a uns efectes més severos que la glucosa. Així, aquestes alteracions, juntament amb l'increment de la lipogènesi i la reducció del catabolisme, podrien ser les responsables de l'aparició d'hipertrigliceridèmia únicament en el grup fructosa.

La hipertrigliceridèmia així com l'augment del contingut de triglicèrids hepàtics i l'increment del pes del fetge obtinguts en el grup fructosa suggereix un augment de la deposició ectòpica de lípids en el fetge. No obstant, en realitzar la valoració histològica no s'observaren signes d'esteatosi hepàtica. Aquests resultats són realment sorprenents donat el gran nombre d'estudis que associen la ingesta de fructosa amb l'aparició d'hipertrigliceridèmia i esteatosi hepàtica [2,49] i especialment considerant estudis realitzats prèviament en el nostre grup d'investigació en els que utilitzant el mateix model (rates femella alimentades amb una solució de fructosa al 10%) durant un període inferior (8 setmanes) sí que s'observà el desenvolupament d'esteatosi hepàtica [7].

Així doncs, novament es contradiu la hipòtesi inicialment plantejada que la prolongació de la suplementació de fructosa agreujaria les alteracions prèviament observades ja que, pel que fa a l'esteatosi, no només no s'intensifica sinó que s'atenua. El fet que l'increment dels triglicèrids hepàtics induïts per la suplementació de fructosa a llarg termini fos insuficient per desenvolupar esteatosi hepàtica, suggereix l'existència d'un mecanisme compensatori que redueixi el contingut de triglicèrids hepàtics.

En aquest sentit, s'ha descrit que l'increment de la fosforilació d'mTOR atenua l'aparició d'esteatosi hepàtica independentment de l'activació d'Akt [458,459]. Per altra banda, també s'ha observat que l'activació d'IRE1 podria estar directament relacionada amb la

prevenció de l'esteatosi hepàtica [460]. Tal i com es detallarà més endavant, l'activació d'mTOR s'ha associat amb l'estimulació específica de la branca IRE1 de la resposta UPR [461], fet que corrobora la importància de l'activació d'mTOR en l'atenuació del desenvolupament de l'esteatosi hepàtica.

Per altra banda, el consum de fructosa tampoc va induir una deposició ectòpica en el múscul, ja que no es modificà el contingut de triglicèrids en el teixit muscular, suggerint que l'acumulació de lípids podria tenir lloc en el teixit adipós. Efectivament, s'obtingué que únicament la ingesta de fructosa produïa un increment en la mida dels adipòcits, fet que indicava que aquestes cèl·lules presentaven un alt contingut en lípids. A més, aquests resultats també coincideixen amb l'increment del pes del teixit adipós observat en els animals del grup fructosa.

En aquesta línia, Alzamendi i col. [462] van demostrar que rates suplementades amb fructosa líquida al 10% presentaven un increment del pes del teixit adipós, així com un augment del diàmetre i el volum dels adipòcits. De manera similar, Crescenzo i col. [80] van observar alteracions en la mida i la morfologia dels adipòcits de rates alimentades durant 8 setmanes amb una dieta que contenia un 30% de fructosa. A més, associaren aquests canvis amb una alteració de la capacitat de la insulina per inhibir la lipòlisi en el teixit adipós.

En el present estudi, s'observà que tant la ingesta de glucosa com de fructosa produïa una disminució de la fosforilació de la proteïna Akt en el teixit adipós, suggerint una disminució de la sensibilitat a la insulina en aquest òrgan i, com a conseqüència, un increment de la capacitat lipolítica. En efecte, s'obtingué un augment significatiu dels nivells plasmàtics de NEFAs en plasma en els dos grups suplementats amb sucre, que sembla indicar un increment de la lipòlisi. No obstant, els nivells proteics de la lipasa HSL i els de p-PKAc no es van veure modificats, mentre que els de l'ATGL només s'incrementaren en el grup glucosa. Aquests resultats aparentment sorprenents podrien explicar-se pel fet que en els animals del grup fructosa, malgrat no observar-se un increment en l'expressió de les lipases, presenten una quantitat de teixit adipós superior als altres grups i per tant la seva capacitat lipolítica total podria estar igualment incrementada.

Així doncs, s'observa que únicament el consum de fructosa produeix una clara acumulació de lípids en el teixit adipós visceral, mentre que la ingesta d'ambdós sucres indueix una disminució de la sensibilitat a la insulina i un increment de la capacitat lipolítica. No obstant, cal tenir present que en aquest estudi només s'ha valorat el teixit adipós visceral i que els efectes observats podrien no correlacionar-se amb altres tipus de teixit adipós. En aquest sentit, un estudi en humans va observar que la ingesta de glucosa produïa un increment del teixit adipós subcutani, mentre que la ingesta de fructosa ho feia del visceral [60].

### 2.3. Efectes en la inflamació, l'estrès oxidatiu i l'estrès de reticle endoplasmàtic

Nombrosos articles han descrit que la ingesta de fructosa contribueix a la patogènesi del NAFLD i al desenvolupament d'alteracions relacionades com la inflamació i l'estrès oxidatiu [463,464]. Així, per exemple, Kelany i col. [465] van descriure que la ingesta d'una dieta rica en fructosa (65%) durant 8 setmanes en rates mascle va produir un increment de biomarcadors d'estrès oxidatiu i d'inflamació en el fetge. També, Zhang i col. [73] van observar que rates suplementades amb una dieta rica en fructosa (32%) desenvolupaven esteatosi hepàtica al cap de 4 setmanes, mentre que després de 8 setmanes ja presentaven característiques de NASH. A més, la ingesta diària de fructosa en pacients amb NAFLD s'ha associat amb l'increment de fibrosi hepàtica [466].

En el present estudi, tot i que el grup fructosa va mostrar una tendència a incrementar l'expressió gènica d'alguns marcadors d'inflamació i fibrosi en el fetge, com ara MCP-1 i Colla1, la majoria dels gens analitzats relacionats amb aquestes alteracions així com amb l'estrès oxidatiu no van resultar afectats. Tampoc s'observaren canvis en els nivells d'ALT en plasma. A més, la valoració de la fibrosi i la necrosi en talls histològics de teixit hepàtic va confirmar l'absència d'aquestes alteracions.

Hi ha evidències que apunten que l'acumulació de triglicèrids en el fetge així com el desenvolupament de la resistència a la insulina poden ser els responsables de l'aparició d'inflamació i d'estrès oxidatiu i per tant d'induir la progressió d'un estat de NAFLD a NASH [32,72]. En aquest estudi, la ingesta de fructosa durant 28 setmanes no va desenvolupar un estat evident d'esteatosi hepàtica ni tampoc de resistència a la insulina, fet que suggereix que aquest pot ser el motiu de l'absència d'aquestes alteracions. Tot i així, en estudis realitzats prèviament en el nostre grup d'investigació, la ingesta de fructosa líquida durant 8 setmanes va induir esteatosi hepàtica en rates femella, però tampoc s'observà un increment de la inflamació, de l'estrès oxidatiu ni es desenvolupà fibrosi ni necrosi hepàtica [8]. En aquesta línia, un estudi clínic va reportar que la ingesta d'altres quantitats de fructosa i glucosa durant 4 setmanes no produïa inflamació en pacients sans [467].

Cal remarcar que la majoria dels estudis que descriuen aquestes alteracions utilitzen alts percentatges de fructosa i sovint en dietes sòlides [76,464]. Per tant, sembla ser que probablement el model experimental, més que la prolongació de la suplementació, té un paper crucial en l'aparició d'aquestes alteracions.

Per altra banda, una alteració que recentment ha pres importància és l'estrès d'ER ja que s'ha observat que podria ser clau en el desenvolupament d'alteracions metabòliques degut a la seva interacció amb l'esteatosi hepàtica, la resistència a la insulina i la inflamació, entre d'altres [250,256]. Alguns estudis han associat el consum de fructosa amb la inducció de l'estrès d'ER. Així, per exemple, Ren i col. [468] van observar que tant la ingesta d'una dieta rica en greixos (60%) com en fructosa (35%) produïa esteatosi hepàtica i resistència a la

insulina, però que només la dieta rica en fructosa induïa a un increment de la lipogènesi, fet que el relacionaven específicament amb l'activació de l'estrès d'ER. També, Balakumar i col. [425] van descriure que tant la ingesta de dietes riques en fructosa, en greixos, així com la seva combinació produïa una inducció de marcadors d'estrès d'ER.

En el present estudi, la ingesta de glucosa i la de fructosa líquida va produir un increment important de la fosforilació d'IRE, el qual va donar lloc a un augment de la forma *splicing* d'XBP-1. No obstant, no s'observà l'activació de JNK, un altra proteïna diana d'IRE. L'increment de la fosforilació de JNK s'ha associat amb fenòmens de resistència a la insulina [255,269], per tant el fet que en el present estudi no resulti activada coincideix amb l'absència d'una evident manifestació d'aquesta alteració en el fetge dels animals suplementats amb sucres. Així, aquests resultats demostren que l'activació d'IRE induïda per la ingesta de sucres promou la seva capacitat endoribonucleasa però, en canvi, no la cinasa.

Pel que fa a les altres dues branques de la resposta UPR, la proteïna PERK ni tampoc cap dels seus gens diana es van veure alterats en els grups suplementats amb sucre. En canvi, els nivells de la proteïna ATF6, així com l'expressió de gens implicats en el procés ERAD (*Dnajb9* i *Edem1*) només incrementaren en el grup fructosa. L'activació d'ATF6 juntament amb la d'XBP1 podria ser la responsable de la inducció del procés ERAD en el grup fructosa, ja que s'ha descrit que ambdós actuen com a factors de transcripció induint l'expressió de gens involucrats en l'ERAD [250,253]. A més, Yamamoto i col. [469] van observar que l'heterodimerització entre ATF6 i XBP1 conduïa a l'activació de processos ERAD.

Així, per una banda, aquests resultats fan palesa l'existència d'efectes diferencials entre la ingesta de glucosa i fructosa sobre la inducció de l'estrès d'ER i, per l'altra, demostren que la ingesta de sucres produeix l'activació selectiva de certes vies de la resposta UPR. Cal destacar que tot i l'observació d'aquestes alteracions, no es pot afirmar que hi hagi una inducció de l'estrès d'ER, ja que tal i com assenyalen Wang i col. [470] només l'activació de les tres vies confirma la presència d'estrès d'ER.

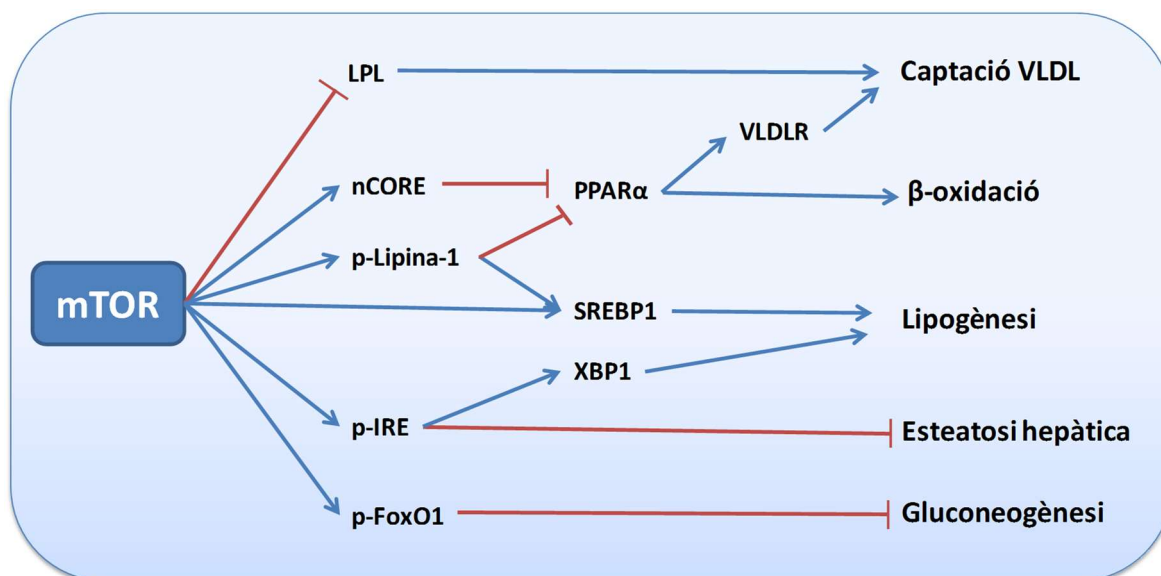
Igualment, altres estudis també han observat l'activació selectiva d'algunes branques de la resposta UPR. Sun i col. [271] van descriure que en ratolins la ingesta d'una dieta rica en fructosa durant tan sols un dia produïa l'activació de la branca IRE, mentre que la ingesta des de 3 dies fins a 8 setmanes induïa les branques IRE i PERK. També, el nostre grup d'investigació va demostrar que la ingesta de fructosa líquida durant un període subcrònic en models murins promovia únicament l'activació hepàtica de la proteïna IRE [7,427]. Considerant aquests estudis, es podria concloure que tot i que la prolongació de la suplementació de fructosa no induïa a una activació completa de l'estrès d'ER, sí que promou una activació més pronunciada de la resposta UPR.

En general, s'ha descrit que l'estrès d'ER s'indueix quan hi ha un increment de la síntesi de proteïnes així com del mal plegament d'aquestes [251,252]. No obstant, el procés pel qual

es produeix l'activació diferencial de les branques de la resposta UPR és incert, però apunta a l'existència de propietats intrínseques dels diferents sensors de la resposta UPR [471].

En aquest sentit, recentment, s'ha identificat una interconnexió entre la resposta UPR i mTOR [472]. Kato i col. [461] van demostrar que l'activació d'mTOR induïx selectivament la via IRE1 sense alterar les vies PERK i ATF6. També, Ning i col. [259] suggerien que una exposició prolongada a la insulina activava específicament la via IRE/XBP1 probablement a través de la senyalització d'mTOR. Així doncs, l'activació d'mTOR observada en les rates suplementades amb sucre podria explicar l'augment específic de la fosforilació d'IRE1 en aquests grups. D'altra banda, s'ha observat que ATF6 podria induir l'activació d'mTOR, a través de l'increment dels nivells de Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) [473]. En conseqüència, l'augment d'ATF6 present en les rates del grup fructosa podria contribuir en part a la major activació d'mTOR en aquest grup respecte el glucosa.

A mode de resum, aquests resultats mostren que tot i presentar la mateixa ingesta calòrica, la suplementació crònica de fructosa induïx l'aparició d'alteracions metabòliques més pronunciades que la de glucosa. Tal i com s'il·lustra en la Figura VI-2, a través de la modulació de diferents vies de senyalització, la major activació de la proteïna mTOR en el grup fructosa podria ser el mecanisme responsable d'aquests efectes diferencials. Com ja s'ha apuntat, la menor activació d'mTOR en el grup glucosa podria ser causada per una menor concentració plasmàtica d'insulina així com per un augment dels nivells d'adiponectina que, al seu torn, poden induir l'activació d'AMPK, la qual podria compensar alguns dels efectes produïts per mTOR.



**Figura VI-2.** Esquema dels possibles mecanismes pels quals mTOR podria induir els efectes observats.

Com ja s'ha comentat, inicialment es va plantejar la hipòtesi que la prolongació de la ingesta de sucres produiria unes alteracions metabòliques més severes. No obstant, la

majoria d'alteracions no detectades després d'una suplementació subcrònica, com ara inflamació, fibrosi i estrès oxidatiu tampoc s'observaren en estudis a llarg termini. A més, sorprenentment, alguns dels efectes presents en estudis subcrònics, com ara l'esteatosi i la resistència hepàtica a la insulina, tampoc van ser detectats (Figura VI-3). Així, probablement, la contínua exposició de sucres a l'organisme va induir a una resposta adaptativa que va atenuar algunes de les alteracions prèviament observades.

	INGESTA SUBCRÒNICA	INGESTA CRÒNICA
Sensibilitat a la insulina	↓ ↓	↓
Esteatosi	↑	=
Inflamació	=	=
Estrès oxidatiu	=	=
Resposta UPR	↑	↑ ↑
Aclariment lipoproteïnes	n.d.	↓

**Figura VI-3.** Esquema de les alteracions produïdes per la ingesta subcrònica (8 setmanes)[7,8] i crònica (28 setmanes) de fructosa. n.d. (no determinat).

## 2.4. Efectes en la funció cognitiva

A part de les alteracions metabòliques, la ingesta de sucres també s'ha associat amb canvis en les funcions cognitives. Mentre alguns autors indiquen que el consum de sucres produeix una millora de les capacitats cognitives [474–476], d'altres evidencien que la ingesta de dietes riques en sucres produeix un dèficit cognitiu [4,308]. En aquest sentit, s'ha suggerit que tot i que la ingesta aguda de sucres, especialment de glucosa, pot potenciar les capacitats cognitives, el seu consum crònic indueix a la seva alteració [327].

En el present estudi, la suplementació aguda de sucres no va produir canvis en cap dels tests realitzats, mentre que la suplementació crònica va produir una disminució del DI en el test NORT únicament en el grup fructosa. Aquesta reducció s'observà especialment en l'avaluació de la memòria a curt termini, però també en la de llarg termini. Tanmateix, no s'alterà cap paràmetre analitzat de l'MWM. Així, s'observa que la ingesta aguda de sucres no produeix canvis en les capacitats cognitives, mentre que el seu consum prolongat (específicament de fructosa) promou certes alteracions.

Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts per Jurdak i col. [327] els quals mostraren que rates mascles que mantingueren una dieta rica en sacarosa (32%) durant 8 setmanes, en el test NORT, realitzaren una menor exploració de l'objecte nou comparat amb el grup control. No obstant, altres estudis també descriuen que la ingesta de fructosa, ja sigui en dietes sòlides o en forma líquida, produeix alteracions en diversos paràmetres de l'MWM



[101,348]. Les diferències obtingudes es poden deure a la utilització de models experimentals i períodes de suplementació diferents. També, alguns autors suggereixen que en el sexe femení els estrògens podrien tenir un paper protector, ja que alguns estudis han observat alteracions en mascles però no en femelles [477].

Cal destacar que l'MWM i el NORT són tests particularment útils per analitzar els efectes de dietes sobre el comportament cognitiu, ja que no utilitzen menjar o aigua com a recompensa. L'MWM és un test validat per avaluar l'aprenentatge espacial i la memòria de referència, mentre que el NORT aporta informació sobre el reconeixement d'objectes [385,386,478]. Per altra banda, tot i que hi ha certa controvèrsia per la dificultat de dissociar la regulació de les funcions cognitives en diferents àrees cerebrals, s'ha suggerit que la memòria de reconeixement és més dependent del còrtex prefrontal, mentre que la memòria espacial ho és de l'hipocamp [479].

Així doncs, aquests resultats apunten que la suplementació crònica de fructosa podria modificar diferencialment la realització de tests espacials i no espacials, alterant específicament certs tipus de memòria. Malauradament, és difícil contrastar aquesta afirmació ja que la majoria d'estudis reportats fins el moment tan sols exposen la realització d'un test de memòria.

És important considerar que el fet que els animals fossin sotmesos dues vegades (a l'inici i al final de l'estudi) als mateixos tests de comportament podria haver influenciat en els resultats obtinguts després d'una suplementació crònica. Tot i que en la realització del segon test es van canviar els objectes utilitzats en el NORT i la situació de la plataforma en l'MWM, l'experiència prèvia podria haver alterat la seva conducta. Aquest fet es posa especialment de manifest en la corba d'aprenentatge de l'MWM realitzada al final de l'estudi, ja que els animals van dur a terme més eficaçment la busca de la plataforma. No obstant, en cap cas afecta a la validesa dels tests ja que tots els grups van ser sotmesos als mateixos procediments experimentals.

Coincidint amb els resultats obtinguts en el NORT, només el grup fructosa va presentar una disminució dels nivells de la proteïna BDNF tant en hipocamp com en còrtex, tot i que la reducció només resultà significativa en hipocamp. BDNF és una neurotrofina que té un paper molt important en la supervivència i la funcionalitat del creixement neuronal. Així, una reducció dels seus nivells pot comportar una alteració tant de la plasticitat sinàptica com de la neurogènesi [308].

Diversos estudis han observat que la ingesta de dietes riques en greixos i sucres produeix una reducció dels nivells de BDNF, fet que s'ha associat amb un dèficit d'aprenentatge i memòria [102,328]. També s'han descrit alteracions en l'expressió d'altres marcadors sinàptics com SYN1 i GAP-43, així com SYP i PSD95 [329,330].

No obstant, en el present estudi no s'observaren canvis en l'expressió d'aquestes proteïnes ni en còrtex ni en hipocamp. Tot i que alguns autors tampoc han descrit aquestes

alteracions [480], sembla ser que la ingesta de fructosa líquida en rates femella durant 28 setmanes indueix a la reducció d'alguns d'aquests factors neurotròfics, però no desencadena un clar dèficit de la seva senyalització. Així, probablement la ingesta de fructosa combinada amb altres factors de risc, com ara la ingesta de dietes riques en greixos, podria conduir a una alteració cognitiva més evident.

Pel que fa al mecanisme, nombrosos estudis han correlacionat positivament el dèficit de memòria amb la resistència a la insulina [315,340]. De fet, s'ha comprovat que alteracions cognitives induïdes per la ingesta de dietes riques en greixos i sucres revertien en millorar la senyalització de la insulina en el CNS [481,482].

En el present estudi es demostra que només la ingesta crònica de fructosa va produir una atenuació de la senyalització de la insulina, principalment en còrtex, ja que produí una disminució dels nivells d'IRS-2 i de la fosforilació d'Akt. A més, aquesta reducció encara s'evidencia més si es consideren aquests paràmetres en relació als nivells plasmàtics d'insulina. En canvi, en hipocamp, tot i que s'observà una tendència a disminuir l'expressió de p-Akt, no s'obtingueren canvis significatius.

Aquests resultats corroboren la relació entre resistència a la insulina i dèficit cognitiu però, contrasten amb nombrosos estudis que demostren alteracions de la senyalització de la insulina en l'hipocamp [314,341]. No obstant, cal remarcar que donat la manca d'estudis que comparen els efectes produïts en còrtex i hipocamp, aquests resultats suggereixen que la ingesta de dietes riques en sucres podria induir alteracions diferencials en àrees cerebrals diferents.

Tot i observar un dèficit de senyalització en la via de la insulina, la ingesta crònica de sucres simples no produí alteracions en la fosforilació de les proteïnes GSK-3 $\beta$  i Tau. Cal considerar però, que donat que aquestes alteracions afavoreixen l'acumulació de  $\beta$ -amiloide i la formació d'NFT, sovint apareixen en fases avançades de malalties neurodegeneratives [315]. Així, aquests resultats suggereixen que es requereix una intervenció més severa per evidenciar aquests canvis.

La resistència a la insulina també s'ha associat amb una reducció de l'activitat d'IDE, un enzim que catalitza el catabolisme de la insulina així com del  $\beta$ -amiloide. En models animals de patologies neurodegeneratives, com l'Alzheimer, o metabòliques, com la diabetis, s'ha descrit una disminució de l'activitat d'IDE i, com a conseqüència, un increment dels nivells de  $\beta$ -amiloide, alteració característica de les patologies cognitives [335,337].

En canvi, en el present estudi, la ingesta crònica de fructosa va produir un increment dels nivells d'IDE en còrtex. Aparentment, aquests resultats podrien ser sorprenents. No obstant, considerant que la insulina regula positivament l'expressió d'IDE [336], la hiperinsulinèmia present en el grup fructosa podria ser-ne la responsable. A més, a diferència del present estudi, els models en els quals s'ha detectat una reducció dels nivells d'IDE presentaven una marcada resistència a la insulina. De fet, l'augment d'IDE podria

induir la degradació d'insulina a nivell cortical, contribuint així a la reducció de l'activació d'IRS i Akt i, conseqüentment, a la disminució de la sensibilitat a la insulina.

Pel que fa als nivells de  $\beta$ -amiloide, s'ha demostrat que la insulina presenta una afinitat d'unió a l'enzim IDE molt superior al  $\beta$ -amiloide [333,334], suggerint que, tot i l'increment d'IDE, els nivells de  $\beta$ -amiloide no es modificaren. A més, malgrat en el present estudi no s'ha avaluat l'expressió de  $\beta$ -amiloide, el fet que els nivells de BACE, un enzim que indueix la seva formació [483], no es modifiquin suggereix que probablement els animals suplementats amb sucres no presentin un increment dels nivells de  $\beta$ -amiloide.

Per altra banda, la literatura també descriu que la inflamació podria tenir un paper molt important en la inducció de disfuncions cognitives. A més, diversos estudis han observat que la ingesta de dietes riques en greixos i sucres promou l'aparició de processos inflamatoris tant en l'hipocamp com en còrtex [308,342].

Així per exemple, Hsu i col. [484] observaren que rates suplementades amb una solució d'HCFS al 11% durant tan sols 1 mes ja presentaven un increment de citocines proinflamatòries en l'hipocamp. De fet, s'ha suggerit que mentre és necessària una exposició crònica a dietes riques en greixos i sucres per poder observar una reducció de factors neurotròfics, una suplementació aguda ja és suficient per induir la secreció de citocines inflamatòries [309].

No obstant, els resultats obtinguts contrasten amb l'evidència exposada, ja que després d'una ingesta crònica de 28 setmanes de fructosa i glucosa líquida no s'observaren canvis en l'expressió gènica de diferents citocines inflamatòries (TNF $\alpha$ , MCP-1, IL-6) ni tampoc en l'expressió de GFAP, un marcador d'astroglíosis, en cap de les àrees cerebrals estudiades. Així, considerant la reducció obtinguda dels nivells de BDNF, aquests resultats suggereixen que la inflamació no sempre precedeix la reducció dels factors neurotròfics.

Tot i això, aparentment l'aparició de marcadors inflamatoris no només depèn de la durada del període de suplementació amb sucres. Pistel i col. [347] observaren que ratolins que mantingueren una dieta rica en greixos (60%) durant 21 setmanes induïren la secreció de citocines inflamatòries en el còrtex, així com un increment de la reactivitat dels astròcits; en canvi, ratolins suplementats amb una dieta *Western*, rica en greixos (41%) i sucres (29%), durant el mateix període no presentaren aquestes alteracions. Així doncs, es confirma que el tipus de dieta també és un factor molt important per a la inducció d'alteracions cognitives.

Un altre mecanisme que podria induir una alteració del dèficit cognitiu és l'estrès oxidatiu, ja que s'ha reportat com una de les alteracions més inicials en la patogènesi de les malalties neurodegeneratives [485].

En el present estudi es demostra que la ingesta de fructosa, però no de glucosa, produeix un increment dels nivells plasmàtics d'AGEs i de TBARS, involucrats en la glicació de

proteïnes i en la peroxidació lipídica, respectivament. Per una banda, la major reactivitat que presenta la fructosa en front la glucosa a produir la reacció de Maillard, podria afavorir l'increment d'AGEs [486]; mentre que per l'altra, la hipertrigliceridèmia present en el grup fructosa podria ser la responsable de l'increment de la peroxidació lipídica [487]. Ambdós processos podrien conduir a l'aparició d'estrès oxidatiu en el cervell. A més, cal destacar que aquest òrgan és especialment susceptible a patir peroxidació lipídica donada l'elevada concentració d'àcids poliinsaturats que presenta [316].

En aquest sentit, malgrat no es mesuraren els nivells de ROS en el cervell, sí que s'obtingué que únicament la fructosa va produir un descens en l'expressió de diferents enzims antioxidants en el còrtex. Així doncs s'observa que la ingesta de fructosa no només va conduir a una incapacitat de la resposta antioxidant per combatre la presència de ROS, sinó que també va promoure una disminució en l'expressió dels enzims antioxidants, fet que suggereix un increment de ROS. Així doncs, l'estrès oxidatiu podria contribuir a l'alteració cognitiva present en el grup fructosa. Coincidint amb els resultats obtinguts, Yin i col. [348] van observar que un model molt similar a l'utilitzat en el present estudi (10% de fructosa durant 16 setmanes) produïa no només una disminució d'enzims antioxidants sinó també un increment dels nivells de ROS i TBARS en còrtex i en hipocamp. A més, aquests autors, així com d'altres [329], relacionen l'augment de l'estrès oxidatiu amb la resistència a la insulina detectada en aquestes zones cerebrals. Donat que en el present estudi s'observà un dèficit de la senyalització a la insulina més pronunciat en el còrtex que en l'hipocamp, això podria explicar en part perquè es va obtenir un increment de l'estrès oxidatiu en el còrtex i no en l'hipocamp dels animals del grup fructosa.

L'increment dels nivells de ROS també s'ha relacionat amb l'existència de disfuncions a nivell mitocondrial [355]. En efecte, els animals suplementats amb fructosa van mostrar alteracions en la biogènesi mitocondrial, ja que s'observà una reducció de la proteïna OPA1, involucrada en els processos de fusió, mentre un increment dels nivells de la proteïna DRP1, relacionada amb els processos de fissió. Així, aquest desequilibri podria ser un dels responsables de l'aparició d'estrès oxidatiu.

Tot i que pocs estudis han investigat l'efecte particular de la ingesta de fructosa sobre la biogènesi mitocondrial en el cervell, sí que hi ha una gran evidència que el consum de dietes riques en greixos i sucres indueix a la seva alteració [356,372,488]. Així, considerant els nombrosos estudis que revelen la relació entre les alteracions mitocondrials i la patogènia dels processos neurodegeneratius [355,489], s'evidencia que aquest podria ser un dels mecanismes pels quals la ingesta de fructosa indueix a deterioraments cognitius.

Per altra banda, s'ha descrit que alts nivells de triglicèrids poden penetrar la BBB i induir alteracions de les funcions cognitives [490]. En aquest sentit, s'ha observat que l'administració de triglicèrids directament al cervell produeix un dèficit de memòria [491]. A més, tal i com s'ha descrit, la hipertrigliceridèmia podria promoure una resistència a la leptina i a la insulina, inhibint les capacitats d'aquestes hormones per regular els processos

d'aprenentatge i memòria [379]. De fet, diversos estudis han suggerit que l'increment dels nivells de triglicèrids podria ser el principal inductor del dèficit cognitiu [101,329].

Així doncs, en conjunt, aquest estudi demostra que la ingesta crònica de fructosa líquida, però no de glucosa, indueix a la reducció de certes capacitats cognitives. La hipertrigliceridèmia present en el grup fructosa podria predisposar a l'aparició d'alteracions com el dèficit de senyalització a la insulina i la disfunció mitocondrial que podrien contribuir al deteriorament cognitiu. Pel que fa al grup glucosa, considerant que un increment dels nivells d'adiponectina, així com l'activació d'AMPK, s'han associat a una millora de les capacitats d'aprenentatge i memòria [372,492], la hiperadiponectinèmia i la manca d'hipertrigliceridèmia podrien ser les responsables de la no inducció del deteriorament cognitiu en aquest grup.

També, cal destacar, que malgrat la gran evidència que demostra la importància de l'hipocamp en el desenvolupament de les funcions cognitives [308,314], en el present estudi s'ha observat que després d'una ingesta de fructosa crònica les alteracions són més pronunciades en el còrtex que en l'hipocamp. Així, es suggereix que el còrtex podria ser més susceptible a patir certes alteracions metabòliques que podrien induir a un dèficit cognitiu. D'aquesta manera, es posa de manifest la importància del còrtex en el desenvolupament d'alteracions cognitives així com la necessitat d'investigar els mecanismes que indueixen aquests efectes diferencials entre les dues zones cerebrals.

Per últim, mencionar que tot i que aquests resultats demostren que la ingesta de fructosa predisposa a l'aparició d'un dèficit cognitiu, es requereix la confluència amb d'altres alteracions per induir el desenvolupament de malalties neurodegeneratives. No obstant, sense dubte, aquest estudi corrobora la creixent evidència de la relació entre alteracions metabòliques i cognitives.

Tal i com es resumeix en la Figura VI-4, i donant resposta a l'últim objectiu plantejat en aquesta tesi, en conjunt, tots els resultats exposats demostren que en condicions isocalòriques la ingesta de fructosa indueix a alteracions més severes que la ingesta de glucosa. A més, el seu consum no només promou l'aparició d'alteracions metabòliques sinó que també afecta les funcions vasculars i cognitives. D'aquesta manera s'evidencia que les alteracions causades per la ingesta de sucres simples no només depenen de la quantitat de calories consumides sinó també del tipus de sucre ingerit.

	GLUCOSA	FRUCTOSA
Sensibilitat a la insulina	=	↓
Resistència a la leptina	↑	↑ ↑
Hipertrigliceridèmia	=	↑
Lipogènesi	↑	↑ ↑
β-oxidació	↓	↓
Aclariment lipoproteïnes	=	↓
Alteracions vasculars	=	↑
Alteracions cognitives	=	↑

**Figura VI-4.** Esquema de les alteracions produïdes per la ingesta de glucosa i fructosa.

## 2.5. Altres consideracions

Nombrosos estudis han investigat els efectes de la ingesta de sucres simples durant períodes aguts i semicrònics. No obstant, donat que molts individus realitzen una ingesta sostinguda de sucres al llarg de la seva vida, hi ha una creixent evidència de la necessitat de determinar els efectes que produeix el seu consum crònic. En aquest sentit, l'estudi de la suplementació de sucres durant 28 setmanes és de gran rellevància ja que permet contribuir a la identificació d'aquests efectes.

Per altra banda, la majoria dels estudis que es realitzen utilitzen animals mascles en el seus procediments experimentals. En aquest sentit, recentment s'ha incrementat l'interès per incloure femelles. Així, els estudis que formen part d'aquesta tesi contribueixen a resoldre aquesta necessitat. No obstant, cal mencionar que a causa del dimorfisme sexual, els resultats obtinguts no es poden extrapolar directament en mascles. Estudis previs realitzats en el nostre grup d'investigació van demostrar que els efectes de la ingesta de fructosa eren més perjudicials en rates femella que en mascle, suggerint un increment superior de l'enzim FK com a principal responsable [120]. No obstant, altres estudis descriuen que, en el sexe femení, la presència d'estrògens confereix protecció contra el desenvolupament d'alteracions [477,493]. D'altra banda, Akar i col. [88] suggereixen que els estrògens, per una banda, podrien atenuar les alteracions vasculars, mentre que per l'altra, podrien potenciar l'increment de triglicèrids i conseqüentment les alteracions metabòliques. Així doncs, tots aquests estudis encara evidencien més la necessitat de realitzar estudis comparatius entre animals dels dos sexes.

També, cal mencionar que tot i la gran dificultat que hi ha per extrapolar en humans resultats obtinguts en animals experimentals, els estudis exposats en la present tesi han

utilitzat un model d'ingesta de sucres en forma líquida que, a diferència dels models extensament usats de dietes sòlides riques en sucres, permet un millor ajustament al patró de consum humà. No obstant, els animals van disposar de les solucions de sucres *ad libitum*, fet que va produir que un percentatge considerable (60-75%) del seu consum calòric provingués de la ingesta de sucres. Com a conseqüència, aquests models també s'allunyen del consum habitual que pot realitzar la població humana. Així, amb l'objectiu de resoldre aquestes circumstàncies, en futurs experiments es restringirà el consum calòric obtingut per les begudes ensucrades.

Finalment, remarcar que el disseny d'aquest estudi permet estudiar específicament els efectes produïts pel consum de sucres simples i, més concretament, diferenciar entre els induïts per la ingesta de fructosa i glucosa. No obstant, cal tenir present que sovint els individus que consumeixen grans quantitats de sucre també presenten altres mals hàbits alimentaris com la ingesta de dietes riques en greixos. En aquest sentit, el nostre grup d'investigació va demostrar que en ratolins la ingesta de fructosa líquida (15% p/v) combinada amb una dieta sòlida *Western* produïa, en condicions isocalòriques, efectes més severes que la dieta *Western* per si mateixa [427]. Així, la ingesta de sucres simples podria agreujar les alteracions induïdes per altres factors dietètics associats a patrons de consum no saludables.





## VII. CONCLUSIONS



The conclusions of the present thesis are:

1. Despite lower caloric intake, subchronic fructose consumption induces worse metabolic and vascular alterations than glucose. Hypertriglyceridemia, as well as increased iNOS and reduced cAMP/PKA/VASP signaling in fructose-supplemented female rats could be responsible for these alterations. Hyperadiponectinemia could act as a protective mechanism through induction of PPAR $\alpha$  and eNOS-phosphorylation in glucose-supplemented rats.
2. Chronic fructose consumption produces hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia increased lipogenesis, reduced fatty acid oxidation and activates specific UPR branches but neither induces hepatic steatosis nor inflammation or oxidative stress. The higher activation of mTOR in fructose consuming rats could be a plausible mechanism to explain the more deleterious effects elicited after fructose than glucose intake.
3. Chronic fructose intake reduces the expression of proteins involved in VLDL clearance such as VLDLR and LPL, probably contributing to its hypertriglyceridemic effect.
4. Long term fructose but not glucose intake impairs object recognition memory. Metabolic disorders such as impaired insulin signaling, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the cortex, promoted in part by high triglyceride plasma levels, could be the culprits.
5. Under equicaloric conditions, fructose consumption is more deleterious to metabolism and cognition than glucose. Thus, these alterations are produced not only by the amount of calories provided by fructose consumption, but also by its particular metabolism.



## VIII. BIBLIOGRAFIA



- [1] Tappy L, Lê K-A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 2010;90:23–46. doi:10.1152/physrev.00019.2009.
- [2] Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E685–94. doi:10.1152/ajpendo.00283.2010.
- [3] Cordner ZA, Tamashiro K. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiol Behav* 2015;1:363–71. doi:10.1016/j.physbeh.2015.06.008.
- [4] Lakhan SE, Kirchgessner A. The emerging role of dietary fructose in obesity and cognitive decline. *Nutr J* 2013;12:114. doi:10.1186/1475-2891-12-114.
- [5] Oron-Herman M, Kamari Y, Grossman E, Yeager G, Peleg E, Shabtay Z, et al. Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am J Hypertens* 2008;21:1018–22. doi:10.1038/ajh.2008.218.
- [6] Alegret M, Roglans N, Laguna JC. Fructose consumption and leptin resistance: what have we learnt from animal studies? In: Belkin R, Hemling A, editors. *Leptin Horm. Funct. dysfunctions Clin. uses*, Nova Science Publishers; 2011, p. 209–30.
- [7] Baena M, Sangüesa G, Hutter N, Sánchez RM, Roglans N, Laguna JC, et al. Fructose supplementation impairs rat liver autophagy through mTORC activation without inducing endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2015;1851:107–16. doi:10.1016/j.bbalip.2014.11.003.
- [8] Baena M, Sangüesa G, Dávalos A, Latasa M-J, Sala-Vila A, Sánchez RM, et al. Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the three major insulin-sensitive tissues. *Sci Rep* 2016;6:26149. doi:10.1038/srep26149.
- [9] Roglans N, Vilà L, Farré M, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, et al. Impairment of hepatic STAT-3 activation and reduction of PPAR $\alpha$  activity in fructose-fed rats. *Hepatology* 2007;45:778–88. doi:10.1002/hep.21499.
- [10] Rebollo A, Roglans N, Baena M, Sánchez RM, Merlos M, Alegret M, et al. Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2014;1841:514–24. doi:10.1016/j.bbalip.2014.01.002.
- [11] Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang D, et al. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2007;86:899–906.
- [12] Galloway JH. Botany in the service of empire: The barbados cane-breeding program and the revival of the caribbean sugar industry, 1880s–1930s. *Ann Assoc Am Geogr* 1996;86:682–706. doi:10.1111/j.1467-8306.1996.tb01772.x.
- [13] White JS. Sucrose, HFCS, and fructose: History, manufacture, composition, applications, and production. In: Rippe JM, editor. *Fruct. High Fruct. Corn Syrup, Sucrose Heal.*, Springer Science+Business Media; 2014, p. 277–91. doi:10.1007/978-1-4899-8077-9.
- [14] Asadi M. *Beet-Sugar Handbook*. Wiley-Inte. John Wiley & Sons; 2007.
- [15] White JS, Hobbs LJ, Fernandez S. Fructose content and composition of commercial HFCS-sweetened carbonated beverages. *Int J Obes (Lond)* 2014;39:1–7. doi:10.1038/ijo.2014.73.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [16] Bantle JP. Dietary fructose and metabolic syndrome and diabetes. *J Nutr* 2009;139:1263S–1268S. doi:10.3945/jn.108.098020.
- [17] Malik VS, Hu FB. Fructose and cardiometabolic health what the evidence from sugar-sweetened beverages tells us. *J Am Coll Cardiol* 2015;66:1615–24. doi:10.1016/j.jacc.2015.08.025.
- [18] Schaefer EJ, Gleason J a, Dansinger ML. Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis. *J Nutr* 2009;139:1257S–1262S. doi:10.3945/jn.108.098186.WHO.
- [19] Baena M, Sangüesa G, Hutter N, Sánchez RM. Fructose effects on human health: Molecular insights from experimental models. *Recent Adv. Pharm. Sci.*, 2014, p. 1–19.
- [20] Popkin BM, Hawkes C. Sweetening of the global diet, particularly beverages: Patterns, trends, and policy responses. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016;4:174–86. doi:10.1016/S2213-8587(15)00419-2.
- [21] Ogden CL, Kit BK, Carroll MD, Park S. Consumption of sugar drinks in the United States, 2005–2008. *NCHS Data Brief* 2011:1–8.
- [22] USDA Economic Research Service - Sugar and Sweeteners Yearbook Tables 2016. <https://www.ers.usda.gov/data-products/sugar-and-sweeteners-yearbook-tables.aspx> (accessed September 13, 2016).
- [23] Johnson RJ, Murray R. Fructose, Exercise, and Health. *Curr Sport Med Rep* 2010;9:253–8. doi:10.1249/JSR.0b013e3181e7def4.
- [24] Popkin BM. Patterns of beverage use across the lifecycle. *Physiol Behav* 2010;100:4–9. doi:10.1016/j.physbeh.2009.12.022.
- [25] Ruiz E, Ávila JM, Castillo A, Valero T, del Pozo S, Rodríguez P, Aranceta-Bartrina J, Gil A, González- Gross M, Ortega RM, Serra-Majem LI V-MGE. Energy intake, profile, and dietary sources in the Spanish population: Findings of the ANIBES study. *Nutrients* 2015;7:4739–62. doi:10.3390/nu7064739.
- [26] International Diabetes Federation Europe. IDF Europe position on added sugar 2016:1–10.
- [27] Hosseini-Esfahani F, Bahadoran Z, Mirmiran P, Hosseinpour-Niazi S, Hosseinpanah F, Azizi F. Dietary fructose and risk of metabolic syndrome in adults: Tehran Lipid and Glucose study. *Nutr Metab (Lond)* 2011;8:50. doi:10.1186/1743-7075-8-50.
- [28] Brouns F. WHO Guideline: “Sugars intake for adults and children” raises some question marks. *Agro Food Ind Hi Tech* 2015;26:34–6.
- [29] Marcos Sánchez A, Lorente Toledano F, Marti del Moral A, Martínez de Victoria Muñoz E, Pérez Martínez G, Picó Segura C, et al. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre objetivos y recomendaciones nutricionales y de actividad física frente a la obesidad en el marco de la Estrategia NAOS. *Rev Del Com Científico La AECOSAN* 2014;19:95–223.
- [30] Melorose J, Perroy R, Careas S. Libro blanco de la nutrición en España. vol. 1. 2015. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.



- [31] Vos MB, Kaar JL, Welsh JA, Van Horn L V, Feig DI, Anderson CAM, et al. Added sugars and cardiovascular disease risk in children. *Circulation* 2016;134. doi:10.1161/CIR.0000000000000439.
- [32] Ferder L, Ferder MD, Inserra F. The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2010;12:105–12. doi:10.1007/s11906-010-0097-3.
- [33] White JS. Straight talk about high-fructose corn syrup: What it is and what it. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1716S–1721S. doi:10.3945/ajcn.2008.25825B.2.
- [34] Campos VC, Tappy L. Physiological handling of dietary fructose-containing sugars: implications for health. *Int J Obes* 2016;40:S6–11. doi:10.1038/ijo.2016.8.
- [35] Le MT, Frye RF, Rivard CJ, Cheng J, McFann KK, Segal MS, et al. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose on the pharmacokinetics of fructose and acute metabolic and hemodynamic responses in healthy subjects. *Metabolism* 2012;61:641–51. doi:10.1016/j.metabol.2011.09.013.
- [36] Stanhope KL, Havel PJ, White JS, Iii VF, Melanson KJ, Angelopoulos TJ, et al. High-fructose corn syrup, energy intake, and appetite regulation. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1722–32. doi:10.3945/ajcn.2008.25825A.2.
- [37] Melanson KJ, Zukley L, Lowndes J, Nguyen V, Angelopoulos TJ, Rippe JM. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose consumption on circulating glucose, insulin, leptin, and ghrelin and on appetite in normal-weight women. *Nutrition* 2007;23:103–12. doi:10.1016/j.nut.2006.11.001.
- [38] Anderson GH. Sugars-containing beverages and post-prandial satiety and food intake. *Int J Obes* 2006;30:S52–9. doi:10.1038/sj.ijo.0803493.
- [39] Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverage may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 2004;79:537–43.
- [40] Foster-Powell K, HA HS, Brand-Miller JC. International table of glycemic index and glycemic load. *Am J Clin Nutr* 2002;76:5–56.
- [41] Stanhope KL, Havel PJ. Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose, or high-fructose corn syrup. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1–5. doi:10.3945/ajcn.2008.25825D.
- [42] Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, et al. Hypothesis: Could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev* 2009;30:96–116. doi:10.1210/er.2008-0033.
- [43] Rippe JM, Tappy L. Sweeteners and health: findings from recent research and their impact on obesity and related metabolic conditions. *Int J Obes* 2016;40:S1–5. doi:10.1038/ijo.2016.7.
- [44] Bray GA. Soft drink consumption and obesity: it is all about fructose. *Curr Opin Lipidol* 2010;21:51–7. doi:10.1097/MOL.0b013e3283346ca2.
- [45] Rippe JM, Angelopoulos TJ. Sucrose, high-fructose corn syrup, and fructose, their metabolism and potential health effects: what do we really know? *Adv Nutr* 2013;4:236–45. doi:10.3945/an.112.002824.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [46] Havel PJ. Dietary fructose: Implications for dysregulation of energy homeostasis and Lipid/Carbohydrate Metabolism. *Nutr Rev* 2005;63:133–57. doi:10.1301/nr.2005.may.133.
- [47] Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med* 2013;34:121–38. doi:10.1016/j.mam.2012.07.001.
- [48] Alegret M, Laguna JC. Opposite fates of fructose in the development of metabolic syndrome. *World J Gastroenterol* 2012;18:4478–80. doi:10.3748/wjg.v18.i33.4478.
- [49] Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2008;48:993–9. doi:10.1016/j.jhep.2008.02.011.
- [50] Malik VS, Schulze MB, Hu FB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2006;84:274–88. doi:84/2/274 [pii].
- [51] Bray GA, Popkin BM. Dietary Sugar and Body Weight: Have We Reached a Crisis in the Epidemic of Obesity and Diabetes?: Health Be Damned! Pour on the Sugar. *Diabetes Care* 2014;37:950–6. doi:10.2337/dc13-2085.
- [52] Kaiser KA, Shikany JM, Keating KD, Allison DB. Will reducing sugar-sweetened beverage consumption reduce obesity? Evidence supporting conjecture is strong, but evidence when testing effect is weak. *Obes Rev* 2013;14:620–33. doi:10.1111/obr.12048.
- [53] Kahn R, Sievenpiper JL. Dietary sugar and body weight: Have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes? - We have but the pox on sugar is overwrought and overworked. *Diabetes Care* 2014;37:957–62. doi:10.2337/dc13-2506.
- [54] Bray GA. Fructose: should we worry? *Int J Obes (Lond)* 2008;32 Suppl 7:S127-31. doi:10.1038/ijo.2008.248.
- [55] Olsen NJ, Heitmann BL. Intake of calorically sweetened beverages and obesity. *Obes Rev* 2009;10:68–75. doi:10.1111/j.1467-789X.2008.00523.x.
- [56] Te Morenga L, Mallard S, Mann J. Dietary sugars and body weight: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. *Bmj* 2012;346:e7492. doi:10.1136/bmj.e7492.
- [57] Sun SZ, Empie MW. Lack of findings for the association between obesity risk and usual sugar-sweetened beverage consumption in adults - A primary analysis of databases of CSFII-1989-1991, CSFII-1994-1998, NHANES III, and combined NHANES 1999-2002. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1523–36. doi:10.1016/j.fct.2007.02.012.
- [58] Brown CM, Dulloo AG, Montani J-P. Sugary drinks in the pathogenesis of obesity and cardiovascular diseases. *Int J Obes (Lond)* 2008;32 Suppl 6:S28–34. doi:10.1038/ijo.2008.204.
- [59] Chong MFF, Fielding BA, Frayn KN. Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1511–20.
- [60] Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer A a, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increase visceral adiposity and lipids and decrease insulin sensitivity in overweight/obese men. *J Clin Invest* 2009;1334:1322–34. doi:10.1172/JCI37385DS1.

- [61] Zhang YH, An T, Zhang RC, Zhou Q, Huang Y, Zhang J. Very high fructose intake increases serum LDL-cholesterol and total cholesterol: A meta-analysis of controlled feeding trials 1 – 3. *J Nutr* 2013;143:1391–8. doi:10.3945/jn.113.175323.
- [62] Bantle JP, Raatz SK, Thomas W, Georgopoulos A. Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1128–34.
- [63] Lê KA, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, et al. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1760–5. doi:10.3945/ajcn.2008.27336.
- [64] Maersk M, Belza A, Stødkilde-Jørgensen H, Ringgaard S, Chabanova E, Thomsen H, et al. Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-mo randomized intervention study. *Am J Clin Nutr* 2012;95:283–9. doi:10.3945/ajcn.111.022533.
- [65] Thresher JS, Podolin DA, Wei Y, Mazzeo RS, Pagliassotti MJ. Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279:R1334-40.
- [66] Castro M, Massa M, Arbeláez L, Schinella G, Gagliardino J, Francini F. Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. *Life Sci* 2015;137:1–6. doi:10.1016/j.lfs.2015.07.010.
- [67] Silbernagel G, Machann J, Unmuth S, Schick F, Stefan N, Häring HU, et al. Effects of 4-week very-high-fructose/glucose diets on insulin sensitivity, visceral fat and intrahepatic lipids: an exploratory trial. *Br J Nutr* 2011;106:79–86. doi:10.1017/S000711451000574X.
- [68] Lê KA, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, et al. A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2006;84:1374–9. doi:10.1073/pnas.1115183109.
- [69] Gallagher C, Keogh JB, Pedersen E, Clifton PM. Fructose acute effects on glucose, insulin, and triglyceride after a solid meal compared with sucralose and sucrose in a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr* 2016;103:1453–7. doi:10.3945/ajcn.115.129866.
- [70] Kolderup A, Svihus B. Fructose metabolism and relation to atherosclerosis, type 2 diabetes, and obesity. *J Nutr Metab* 2015;2015:8203081. doi:10.1155/2015/823081.
- [71] Assy N, Nasser G, Kamayse I, Nseir W, Beniashvili Z, Djibre A, et al. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. *Can J Gastroenterol* 2008;22:811–6.
- [72] Collison KS, Saleh SM, Bakheet RH, Al-Rabiah RK, Inglis AL, Makhoul NJ, et al. Diabetes of the liver: the link between nonalcoholic fatty liver disease and HFCS-55. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:2003–13. doi:10.1038/oby.2009.58.
- [73] Zhang HF, Shi LJ, Song GY, Cai ZG, Wang C, An RJ. Protective effects of matrine against progression of high-fructose diet-induced steatohepatitis by enhancing antioxidant and anti-inflammatory defences involving Nrf2 translocation. *Food Chem Toxicol* 2013;55:70–7. doi:10.1016/j.fct.2012.12.043.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [74] Cox CL, Stanhope KL, Schwarz JM, Graham JL, Hatcher B, Griffen SC, et al. Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks reduces net fat oxidation and energy expenditure in overweight/obese men and women. *Eur J Clin Nutr* 2012;66:201–8. doi:10.1038/ejcn.2011.159.
- [75] Bernatova I. Endothelial Dysfunction in Experimental Models of Arterial Hypertension: Cause or Consequence? *Biomed Res Int* 2014;2014:598271. doi:10.1155/2014/598271.
- [76] Moore JB, Gunn PJ, Fielding BA. The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* 2014;6:5679–703. doi:10.3390/nu6125679.
- [77] Stanhope KL, Schwarz J-M, Havel PJ. Adverse metabolic effects of dietary fructose: results from the recent epidemiological, clinical, and mechanistic studies. *Curr Opin Lipidol* 2013;24:198–206. doi:10.1097/MOL.0b013e3283613bca.
- [78] Pollock NK, Bundy V, Kanto W, Davis CL, Bernard PJ, Zhu H, et al. Greater fructose consumption is associated with cardiometabolic risk markers and visceral adiposity in adolescents. *J Nutr* 2012;142:251–7. doi:10.3945/jn.111.150219.
- [79] Jensen M. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:57–63. doi:10.1210/jc.2008-1585.
- [80] Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Valiante S, Liverini G, et al. Adipose tissue remodeling in rats exhibiting fructose-induced obesity. *Eur J Nutr* 2014;53:413–9. doi:10.1007/s00394-013-0538-2.
- [81] Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* 2005;2:5. doi:10.1186/1743-7075-2-5.
- [82] Saad AF, Dickerson J, Kechichian TB, Yin H, Gamble P, Salazar A, et al. High-fructose diet in pregnancy leads to fetal programming of hypertension, insulin resistance, and obesity in adult offspring. *Am J Obstet Gynecol* 2016;215:378e1-e6. doi:10.1016/j.ajog.2016.03.038.
- [83] Vilà L, Roglans N, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of Fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology* 2008;48:1506–16. doi:10.1002/hep.22523.
- [84] Kovačević S, Nestorov J, Matić G, Elaković I. Fructose-enriched diet induces inflammation and reduces antioxidative defense in visceral adipose tissue of young female rats. *Eur J Nutr* 2017;56:151–60. doi:10.1007/s00394-015-1065-0.
- [85] Perez-Pozo SE, Schold J, Nakagawa T, Sánchez-Lozada LG, Johnson RJ, Lillo JL. Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. *Int J Obes (Lond)* 2010;34:454–61. doi:10.1038/ijo.2009.259.
- [86] Jalal DI, Smits G, Johnson RJ, Chonchol M. Increased fructose associates with elevated blood pressure. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1543–9. doi:10.1681/ASN.2009111111.
- [87] De Koning L, Malik VS, Kellogg MD, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Sweetened beverage consumption, incident coronary heart disease, and biomarkers of risk in men. *Circulation* 2012;125:1735–41. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067017.

- [88] Akar F, Uludag O, Aydin A, Aytakin YA, Elbeg S, Tuzcu M, et al. High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: Protective effect of resveratrol. *Food Chem Toxicol* 2012;50:2135–41. doi:10.1016/j.fct.2012.03.061.
- [89] D'Angelo G, Elmarakby AA, Pollock DM, Stepp DW. Fructose feeding increases insulin resistance but not blood pressure in Sprague-Dawley rats. *Hypertension* 2005;46:806–11. doi:10.1161/01.HYP.0000182697.39687.34.
- [90] Madero M, Perez-Pozo SE, Jalal D, Johnson RJ, Sánchez-Lozada LG. Dietary fructose and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2011;13:29–35. doi:10.1007/s11906-010-0163-x.
- [91] Tapia E, Cristóbal M, García-Arroyo FE, Soto V, Monroy-Sánchez F, Pacheco U, et al. Synergistic effect of uricase blockade plus physiological amounts of fructose-glucose on glomerular hypertension and oxidative stress in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013;304:F727-36. doi:10.1152/ajprenal.00485.2012.
- [92] Zoccali C, Maio R, Mallamaci F, Sesti G, Perticone F. Uric Acid and Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1466–71. doi:10.1681/ASN.2005090949.
- [93] Hutter N, Baena M, Sangüesa G, Dávalos A, Latasa MJ, Escolà-Gil JC, et al. Liquid fructose supplementation in LDL-R<sup>-/-</sup> mice fed a western-type diet enhances lipid burden and atherosclerosis despite identical calorie consumption. *IJC Metab Endocr* 2015;9:12–21. doi:10.1016/j.ijcme.2015.10.002.
- [94] Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Despres JP, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2010;33:2477–81. doi:10.2337/dc10-1079.
- [95] Kelishadi R, Mansourian M, Heidari-Beni M. Association of fructose consumption and components of metabolic syndrome in human studies: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition* 2014;30:503–10. doi:10.1016/j.nut.2013.08.014.
- [96] Stanhope KL. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015;8363:1–16. doi:10.3109/10408363.2015.1084990.
- [97] Greenwood DC, Threapleton DE, Evans CEL, Cleghorn CL, Nykjaer C, Woodhead C, et al. Association between sugar-sweetened and artificially sweetened soft drinks and type 2 diabetes: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Br J Nutr* 2014;112:725–34. doi:10.1017/S0007114514001329.
- [98] Wang M, Yu M, Fang L, Hu R-Y. Association between sugar-sweetened beverages and type 2 diabetes: A meta-analysis. *J Diabetes Investig* 2015;6:360–6. doi:10.1111/jdi.12309.
- [99] The InterAct consortium. Consumption of sweet beverages and type 2 diabetes incidence in European adults: Results from EPIC-InterAct. *Diabetologia* 2013;56:1520–30. doi:10.1007/s00125-013-2899-8.
- [100] Teff KL, Grudziak J, Townsend RR, Dunn TN, Grant RW, Adams SH, et al. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;150:2016–7.
- [101] Ross AP, Bartness TJ, Mielke JG, Parent MB. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiol Learn Mem* 2009;92:410–6. doi:10.1016/j.nlm.2009.05.007.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [102] Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Go F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* 2002;112:803–14.
- [103] Stephan BCM, Wells JCK, Brayne C, Albanese E, Siervo M. Increased fructose intake as a risk factor for dementia. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 2010;65 A:809–14. doi:10.1093/gerona/gdq079.
- [104] Xu WL, Atti AR, Gatz M, Pedersen NL, Johansson B, Fratiglioni L. Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: A population-based twin study. *Neurology* 2011;76:1568–74. doi:10.1212/WNL.0b013e3182190d09.
- [105] Stanhope KL. Role of fructose-containing sugars in the epidemics of obesity and metabolic syndrome. *Annu Rev Med* 2012;63:329–43. doi:10.1146/annurev-med-042010-113026.
- [106] Ferreira-Pego C, Babio N, Bes-Rastrollo M, Corella D, Estruch R, Ros E, et al. Frequent Consumption of Sugar- and Artificially Sweetened Beverages and Natural and Bottled Fruit Juices Is Associated with an Increased Risk of Metabolic Syndrome in a Mediterranean Population at High Cardiovascular Disease. *J Nutr* 2016;146:1528.1536. doi:10.3945/jn.116.230367.
- [107] Marriott BP, Cole N, Lee E. National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. *J Nutr* 2009;139:1228S–1235S. doi:10.3945/jn.108.098277.
- [108] Pereira MA. Sugar-sweetened and artificially-sweetened beverages in relation to obesity risk. *Adv Nutr* 2014;5:797–808. doi:10.3945/an.114.007062.
- [109] Ebbeling C, Feldman H, Chomitz V, Antonelli T, Gortmaker S, Osganian S, et al. A Randomized Trial of Sugar-Sweetened Beverages and Adolescent Body Weight. *N Engl J Med* 2012;367:1407–16. doi:110.1056/NEJMoa1203388.
- [110] Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr* 1993;58:754S–765S.
- [111] Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: A review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem* 2009;332:145–59. doi:10.1007/s11010-009-0184-4.
- [112] Brown L, Panchal SK. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011. doi:10.1155/2011/351982.
- [113] Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Jiménez A, Bautista P, Cristóbal M, Nepomuceno T, et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F423–9. doi:10.1152/ajprenal.00124.2006.
- [114] Roglans N, Sanguino E, Peris C, Alegret M, Vazques M, Adzet T, et al. Atorvastatin Treatment Induced Peroxisome Proliferator- Activated Receptor  $\alpha$  expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose- fed rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:232–9.
- [115] Janket S, JE M, Sesso H, Buring J, Liu S. A prospective study of sugar intake and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2003;26:1008–15.

- [116] Schulze MB, Manson JE, Ludwig DS, Colditz G a, Stampfer MJ, Willett WC. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *J Am Med Assoc* 2004;292:927–34. doi:10.1001/jama.292.8.927.
- [117] Ruff JS, Hugentobler SA, Suchy AK, Sosa MM, Tanner RE, Hite ME, et al. Compared to sucrose, previous consumption of fructose and glucose monosaccharides reduces survival and fitness of female mice. *J Nutr* 2015;145:434–41. doi:10.3945/jn.114.202531.
- [118] Bundalo MM, Zivkovic MD, Romic SD, Tepavcevic SN, Koricanac GB, Djuric TM, et al. Fructose-rich diet induces gender-specific changes in expression of the renin-angiotensin system in rat heart and upregulates the ACE/AT1R axis in the male rat aorta. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 2016;17:1470320316642915. doi:10.1177/1470320316642915.
- [119] Couchepin C, Lê K-A, Bortolotti M, da Encarnação J, Oboni J, Tran C, et al. Markedly blunted metabolic effects of fructose in healthy young female subjects. *Diabetes Care* 2008;31:2001–3. doi:10.2337/dc07-2001.Clinical.
- [120] Vilà L, Roglans N, Perna V, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Alegret M, et al. Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose. *J Nutr Biochem* 2011;22:741–51. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.06.005.
- [121] Rebollo A, Roglans N, Baena M, Padrosa A, Sánchez RM, Merlos M, et al. Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats. *J Nutr Biochem* 2014;25:250–8. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.10.014.
- [122] Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med* 2013;4:624–30.
- [123] Strable M, Ntambi J. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010;45:199–214. doi:10.3109/10409231003667500.
- [124] Paglialunga S, Dehn CA. Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis* 2016;15:159. doi:10.1186/s12944-016-0321-5.
- [125] Ameer F, Scanduzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 2014;63:895–902. doi:10.1016/j.metabol.2014.04.003.
- [126] Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. Lehninger. Principios de bioquímica. 6a. ed. Omega; 2015.
- [127] Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 2014;1:177–97. doi:10.1002/cphy.c130024.
- [128] Jones JG. Hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 2016;59:1098–103. doi:10.1007/s00125-016-3940-5.
- [129] Coleman R, D M. Mammalian triacylglycerol metabolism: Synthesis, lipolysis and signaling. *Chem Rev* 2011;10:6359–86. doi:10.1021/cr100404w.
- [130] Wong RH, Sook Sul H. Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:684–91. doi:10.1016/j.coph.2010.08.004.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [131] Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis—a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, Obes Metab* 2010;12:83–92. doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01275.x.
- [132] Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7281–6. doi:10.1073/pnas.0401516101.
- [133] Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): Two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 2005;87:81–6. doi:10.1016/j.biochi.2004.11.008.
- [134] Errico TL, Chen X, Martin JM, Julve J. Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas 2016;25:98–103.
- [135] Choi SH, Ginsberg HN. Increased Very Low Density Lipoprotein secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2011;11:353–63. doi:doi:10.1016/j.tem.2011.04.007.
- [136] Tiwari S, Siddiqi SA. Intracellular trafficking and secretion of Very Low Density Lipoproteins. *Arter Thromb Vasc Biol* 2012;32:1079–86. doi:doi:10.1161/ATVBAHA.111.241471.
- [137] Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1695–727. doi:10.1515/cclm-2013-0358.
- [138] Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to lipids and lipoproteins. MDText.com, Inc.; 2000.
- [139] Hu L, van der Hoogt CC, Espirito Santo SMS, Out R, Kypreos KE, van Vlijmen BJM, et al. The hepatic uptake of VLDL in *Irp-ldlr*<sup>-/-</sup>*vldlr*<sup>-/-</sup> mice is regulated by LPL activity and involves proteoglycans and SR-BI. *J Lipid Res* 2008;49:1553–61. doi:10.1194/jlr.M800130-JLR200.
- [140] Espirito Santo SMS, Rensen PCN, Goudriaan JR, Bensadoun A, Bovenschen N, Voshol PJ, et al. Triglyceride-rich lipoprotein metabolism in unique VLDL receptor, LDL receptor, and LRP triple-deficient mice. *J Lipid Res* 2005;46:1097–102. doi:10.1194/jlr.C500007-JLR200.
- [141] Frykman PK, Brown MS, Yamamoto T, Goldstein JL, Herz J. Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:8453–7. doi:10.1073/pnas.92.18.8453.
- [142] Goudriaan JR, Tacke PJ, Dahlmans VE, Gijbels MJ, van Dijk KW, Havekes LM, et al. Protection from obesity in mice lacking the VLDL receptor. *Arter Thromb Vasc Biol* 2001;21:1488–93. doi:10.1161/hq0901.095147.
- [143] Sundaram M, Yao Z. Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion. *Nutr Metab (Lond)* 2010;7:35. doi:10.1186/1743-7075-7-35.
- [144] Latimer J, Batty JA, Neely DD, Kunadian V. PCSK9 inhibitors in the prevention of cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* 2016;42:1–15. doi:10.1007/s11239-016-1364-1.



- [145] Bastin J. Regulation of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation in human: What can we learn from inborn fatty acid  $\beta$ -oxidation deficiencies? *Biochimie* 2014;96:113–20. doi:10.1016/j.biochi.2013.05.012.
- [146] Holloway GP, Luiken JJFP, Glatz JFC, Spriet LL, Bonen A. Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: An overview. *Acta Physiol* 2008;194:293–309. doi:10.1111/j.1748-1716.2008.01878.x.
- [147] Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, STANLEY WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 2010;90:207–58. doi:10.1152/physrev.00015.2009.
- [148] Schreurs M, Kuipers F, Van Der Leij FR. Regulatory enzymes of mitochondrial  $\beta$ -oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes Rev* 2010;11:380–8. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00642.x.
- [149] Burri L, Thoresen GH, Berge RK. The role of PPAR activation in liver and muscle. *PPAR Res* 2010:1–11. doi:10.1155/2010/542359.
- [150] Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 2014;53:124–44. doi:10.1016/j.plipres.2013.12.001.
- [151] Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab* 2009;9:327–38. doi:10.1016/j.cmet.2009.02.006.
- [152] Solinas G, Borén J, Dulloo AG. De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe? *Mol Metab* 2015;4:367–77. doi:10.1016/j.molmet.2015.03.004.
- [153] Walther, T C, V FR. Lipid droplets and cellular lipid metabolism 2012;81:687–714. doi:10.1146/annurev-biochem-061009-102430.
- [154] Bolsoni-Lopes A, Isabel Alonso-Vale MC, Isabel Alonso Vale MC. Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update. *Arch Endocrinol Metab* 2015;59:344–51. doi:10.1590/2359-3997000000067.
- [155] Osuga J -i., Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, et al. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:787–92. doi:10.1073/pnas.97.2.787.
- [156] Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, et al. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 2002;277:4806–15. doi:10.1074/jbc.M110355200.
- [157] Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS. Regulation of triglyceride metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G1–4. doi:10.1152/ajpgi.00554.2006.
- [158] Taschler U, Radner FPW, Heier C, Schreiber R, Schweiger M, Schoiswohl G, et al. Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J Biol Chem* 2011;286:17467–77. doi:10.1074/jbc.M110.215434.
- [159] Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev* 2013;27:459–84. doi:10.1101/gad.209296.112.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [160] Frühbeck G, Méndez-Giménez L, Fernández-Formoso J-A, Fernández S, Rodríguez A. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev* 2014;27:63–93. doi:10.1017/S095442241400002X.
- [161] Zimmermann R, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-gruenberger R, Riederer M, Lass A, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 2004;306:1383–6. doi:10.1126/science.1100747.
- [162] Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20:665–79. doi:10.1016/j.beem.2006.09.007.
- [163] Saltiel AR. Insulin signaling in the control of glucose and lipid homeostasis. *Handb. Exp. Pharmacol.*, Springer International Publishing Switzerland; 2015. doi:10.1007/164\_2015\_14.
- [164] Zhang J, Liu F. Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging. *IUBMB Life* 2014;66:485–95. doi:10.1002/iub.1293.
- [165] Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari Va, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;93:S52–9. doi:10.1016/S0168-8227(11)70014-6.
- [166] Ma L, Wang J, Li Y. Insulin resistance and cognitive dysfunction. *Clin Chim Acta* 2015;444:18–23. doi:10.1016/j.cca.2015.01.027.
- [167] Gray SM, Meijer RI, Barrett EJ. Insulin regulates brain function, but how does it get there? *Diabetes* 2014;63:3992–7. doi:10.2337/db14-0340.
- [168] Cersosimo E, DeFronzo RA. Insulin resistance and endothelial dysfunction: The road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev* 2006;22:423–36. doi:10.1002/dmrr.634.
- [169] Thirone AC, Huang C, Klip A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab* 2006;17:72–8. doi:10.1016/j.tem.2006.01.005.
- [170] Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med* 2005;22:674–82.
- [171] Lorenzo-Velázquez B, Lorenzo Fernández P de. *Farmacología básica y clínica*. Médica Panamericana; 2008.
- [172] Takahashi-Yanaga F. Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target. *Biochem Pharmacol* 2013;86:191–9. doi:10.1016/j.bcp.2013.04.022.
- [173] Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models to disease mechanisms. *J Endocrinol* 2014;220:1–36. doi:10.1530/JOE-13-0327.
- [174] Dong XC, Capps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, Depinho A, et al. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell Metab* 2008;1:65–76. doi:10.1016/j.cmet.2008.06.006.
- [175] Oh K-J, Han H-S, Kim M-J, Koo S-H. CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Rep* 2013;46:567–74. doi:10.5483/BMBRep.2013.46.12.248.
- [176] Yu J, Auwerx J. The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis 2009;1173:1–12. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04952.x.

- [177] Howell JJ, Manning BD. mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22:94–102. doi:10.1016/j.tem.2010.12.003.
- [178] Houde VP, Brûlé S, Festuccia WT, Blanchard PG, Bellmann K, Deshaies Y, et al. Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. *Diabetes* 2010;59:1338–48. doi:10.2337/db09-1324.
- [179] Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 2001;292:1728–31. doi:10.1126/science.292.5522.1728.
- [180] Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, et al. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and growth deficiency in mice lacking Akt2/PKBb. *J Clin Invest* 2003;112:197–208. doi:10.1172/JCI16885 [pii].
- [181] Bakan I, Laplante M. Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation. *Curr Opin Lipidol* 2012;23:226–34. doi:10.1097/MOL.0b013e328352dd03.
- [182] Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Seong A, Balderas E, et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 2011;146:408–20. doi:10.1016/j.cell.2011.06.034.mTOR.
- [183] Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad N a. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res* 2009;50:S86–90. doi:10.1194/jlr.R800085-JLR200.
- [184] Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Arter Thromb Vasc Biol* 2012;32:2052–9. doi:10.1161/ATVBAHA.111.241919.
- [185] Samuel V, Shulman G. Integrating mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 2012;148:852–71. doi:10.1016/j.cell.2012.02.017.Integrating.
- [186] Delibegovic M, Zimmer D, Kauffman C, Rak K, Hong E, Cho Y, et al. Liver-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B improves metabolic syndrome and attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress. *Diabetes* 2009;58:590–9. doi:10.2337/db08-0913.
- [187] Torisu T, Sato N, Yoshiga D, Kobayashi T, Yoshioka T, Mori H, et al. The dual function of hepatic SOCS3 in insulin resistance in vivo. *Genes to Cells* 2007;12:143–54. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01044.x.
- [188] Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-verhelle D, Hilton D, Obberghen E Van. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem* 2000;275:15985–91.
- [189] Vadacca M, Margiotta DP, Navarini L, Afeltra A. Leptin in immuno-rheumatological diseases. *Cell Mol Immunol* 2011;8:203–12. doi:10.1038/cmi.2010.75.
- [190] Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: Central and peripheral actions of leptin. *Metabolism* 2015;64:35–46. doi:10.1016/j.metabol.2014.10.015.
- [191] Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism* 2015;64:13–23. doi:10.1016/j.metabol.2014.09.010.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [192] Kwon O, Kim KW, Kim MS. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:1457–77. doi:10.1007/s00018-016-2133-1.
- [193] Drougard A, Fournel A, Valet P, Knauf C. Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Front Neurosci* 2015;9:1–12. doi:10.3389/fnins.2015.00056.
- [194] Ramírez S, Claret M. Hypothalamic ER stress: A bridge between leptin resistance and obesity. *FEBS Lett* 2015;589:1678–87. doi:10.1016/j.febslet.2015.04.025.
- [195] Triantafyllou GA, Paschou SA, Mantzoros CS. Leptin and hormones: Energy Homeostasis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2016;45:633–45. doi:10.1016/j.ecl.2016.04.012.
- [196] Morton G, Schwartz M. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev* 2011;389–411. doi:10.1152/physrev.00007.2010.
- [197] Fernández-Formoso G, Pérez-Sieira S, González-Touceda D, Dieguez C, Tovar S. Leptin, 20 years of searching for glucose homeostasis. *Life Sci* 2015;140:4–9. doi:10.1016/j.lfs.2015.02.008.
- [198] German J, Kim F, Schwartz GJ, Havel PJ, Rhodes CJ, Schwartz MW, et al. Hypothalamic leptin signaling regulates hepatic insulin sensitivity via a neurocircuit involving the vagus nerve. *Endocrinology* 2009;150:4502–11. doi:10.1210/en.2009-0445.
- [199] Sáinz N, Rodríguez A, Catalán V, Becerril S, Ramírez B, Lancha A, et al. Leptin reduces the expression and increases the phosphorylation of the negative regulators of GLUT4 traffic TBC1D1 and TBC1D4 in muscle of ob/ob mice. *PLoS One* 2012;7:1–12. doi:10.1371/journal.pone.0029389.
- [200] Ruud J, Brüning JC. Light on leptin link to lipolysis. *Nature* 2015;527:43–4. doi:10.1038/527043a.
- [201] Harris R. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:414–23. doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.009.
- [202] Könner AC, Klöckener T, Brüning JC. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: Targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav* 2009;97:632–8. doi:10.1016/j.physbeh.2009.03.027.
- [203] Bates SH, Stearns WH, Dundon T a, Schubert M, Tso AWK, Wang Y, et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 2003;421:856–9. doi:10.1038/nature01388.
- [204] Kitamura T, Feng Y, Kitamura YI, Chua SC, Xu AW, Barsh GS, et al. Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. *Nat Med* 2006;12:534–40. doi:10.1038/nm1392.
- [205] Niswender KD, Morton GJ, W.H. S, Rhodes CJ, Myers MG, Schwartz MW. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 2001;413:794. doi:10.1038/35101654.
- [206] Hardie DG, Ross F a, Hawley S a. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:251–62. doi:10.1038/nrm3311.

- [207] Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim Y-B, Lee A, Xue B, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004;428:569–74. doi:10.1038/nature02440.
- [208] Minokoshi Y, Kim Y-B, Peroni OD, Fryer LGD, Müller C, Carling D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002;415:339–43. doi:10.1038/415339a.
- [209] Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995;1:1155–61. doi:10.1038/nm0495-365.
- [210] Considine R V, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;334:292–5. doi:10.1097/00019616-199607000-00020.
- [211] Frederich R., Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell B b., Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1995;1:1311–4. doi:10.1038/nm0495-365.
- [212] Münzberg H. Leptin-signaling pathways and leptin resistance. *Front Eat Weight Regul* 2009;63:123–32. doi:10.1159/000264400.
- [213] Balland E, Cowley MA. New insights in leptin resistance mechanisms in mice. *Front Neuroendocrinol* 2015;39:59–65. doi:10.1016/j.yfrne.2015.09.004.
- [214] Banks WA, Farr SA, Morley JE. The effects of high fat diets on the blood-brain barrier transport of leptin: Failure or adaptation? *Physiol Behav* 2006;88:244–8. doi:10.1016/j.physbeh.2006.05.037.
- [215] Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, et al. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab* 2007;5:181–94. doi:10.1016/j.cmet.2007.02.004.
- [216] White CL, Whittington A, Barnes MJ, Wang Z, Bray G a, Morrison CD. HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E291–9. doi:10.1152/ajpendo.90513.2008.
- [217] Reed AS, Unger EK, Olofsson LE, Piper ML, Jr MGM, Xu AW. Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. *Diabetes* 2010;59:894–906. doi:10.2337/db09-1024.A.S.R.
- [218] Picardi PK, Calegari VC, Prada PDO, Moraes JC, Araújo E, Marcondes MCGG, et al. Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. *Endocrinology* 2008;149:3870–80. doi:10.1210/en.2007-1506.
- [219] Sahu A, Metlakunta AS. Hypothalamic phosphatidylinositol 3-kinase-phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway of leptin signalling is impaired following chronic central leptin infusion. *J Neuroendocrinol* 2005;17:720–6. doi:10.1111/j.1365-2826.2005.01362.x.
- [220] de Git KCG, Adan RAH. Leptin resistance in diet-induced obesity: The role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev* 2015;16:207–24. doi:10.1111/obr.12243.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [221] Benzler J, Ganjam GK, Pretz D, Oelkrug R, Koch CE, Legler K, et al. Central inhibition of IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B signaling attenuates high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *Diabetes* 2015;64:2015–27. doi:10.2337/db14-0093.
- [222] Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 2009;9:35–51. doi:10.1016/j.cmet.2008.12.004.
- [223] Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity. *Cell* 2008;135:61–73. doi:10.1016/j.cell.2008.07.043.
- [224] Won JC, Jang P-G, Namkoong C, Koh EH, Kim SK, Park J-Y, et al. Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:1861–5. doi:10.1038/oby.2009.194.
- [225] Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol* 2016;8:101–9. doi:10.1093/jmcb/mjw014.
- [226] Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O, Lee YS. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Horm J Endocrinol Metab* 2012;11:8–20.
- [227] Ye R, Scherer PE. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? *Mol Metab* 2013;2:133–41. doi:10.1016/j.molmet.2013.04.001.
- [228] Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, et al. New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *Biomed Res Int* 2014;2014:658913. doi:10.1155/2014/658913.
- [229] Hoffstedt J, Arvidsson E, Sjölin E, Wåhlén K, Arner P. Adipose tissue adiponectin production and adiponectin serum concentration in human obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1391–6. doi:10.1210/jc.2003-031458.
- [230] Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001;108:1875–81. doi:10.1172/JCI200114120.
- [231] Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001;7:947–53. doi:10.1038/90992.
- [232] Ouedraogo R, Gong Y, Berzins B, Wu X, Mahadev K, Hough K, et al. Adiponectin deficiency increases leukocyte- endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo. *J Clin Invest* 2007;117:1718–26. doi:10.1172/JCI29623.
- [233] Deepa SS, Dong LQ. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:22–36. doi:10.1152/ajpendo.90731.2008.
- [234] Yamauchi T, Kadowaki T. Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. *Cell Metab* 2013;17:185–96. doi:10.1016/j.cmet.2013.01.001.
- [235] Zhou L, Deepa SS, Etzler JC, Ryu J, Mao X, Fang Q, et al. Adiponectin activates AMP-activated protein kinase in muscle cells via APPL1/LKB1-dependent and phospholipase C/Ca<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 2009;284:22426–35. doi:10.1074/jbc.M109.028357.

- [236] Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, et al. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol* 2006;8:516–23. doi:10.1038/ncb1404.
- [237] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002;8:1288–95. doi:10.1038/nm788.
- [238] Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kaneko K, Okazaki Y, et al. Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;382:51–6. doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.131.
- [239] Chen H, Zhang L, Li X, Li X, Sun G, Yuan X, et al. Adiponectin activates the AMPK signaling pathway to regulate lipid metabolism in bovine hepatocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013;138:445–54. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.08.013.
- [240] Wedellová Z, Dietrich J, Šiklová-Vítková M, Kološtová K, Kováčiková M, Dušková M, et al. Adiponectin inhibits spontaneous and catecholamine-induced lipolysis in human adipocytes of non-obese subjects through AMPK-dependent mechanisms. *Physiol Res* 2011;60:139–48.
- [241] Anthony NM, Gaidhu MP, Ceddia RB. Regulation of visceral and subcutaneous adipocyte lipolysis by acute AICAR-induced AMPK activation. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:1312–7. doi:10.1038/oby.2008.645.
- [242] Kim S, Tang T, Abbott M, Viscarra JA, Wang Y, Sul HS. AMPK phosphorylates desnutrin/ATGL and hormone-sensitive lipase to regulate lipolysis and fatty acid oxidation within adipose tissue. *Mol Cell Biol* 2016;36:1961–76. doi:10.1128/MCB.00244-16.
- [243] Heiker JT, Kosel D, Beck-Sickinger AG. Molecular mechanisms of signal transduction via adiponectin and adiponectin receptors. *Biol Chem* 2010;391:1005–18. doi:10.1515/BC.2010.104.
- [244] Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006;6:772–83. doi:10.1038/nri1937.
- [245] Cheng KKY, Lam KSL, Wang Y, Huang Y, Carling D, Wu D, et al. Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells. *Diabetes* 2007;56:1387–94. doi:10.2337/db06-1580.
- [246] Yoon MJ, Lee GY, Chung J-J, Ahn YH, Hong SH, Kim JB. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes* 2006;55:2562–70. doi:10.2337/db05-1322.
- [247] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941–6. doi:10.1038/90984.
- [248] Ryu J, AK G, Xin X, Dong F, Abdul-Ghani M, Zhou L, et al. APPL1 potentiates insulin sensitivity by facilitating the binding of IRS1/2 to the insulin receptor. *Cell Rep* 2014;7:1227–38. doi:10.1016/j.celrep.2014.04.006.
- [249] Yamauchi T, Kadowaki T. Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. *Int J Obes* 2008;32 Suppl 7:S13–8. doi:10.1038/ijo.2008.233.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [250] Ozcan L, Tabas I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med* 2012;63:317–28. doi:10.1146/annurev-med-043010-144749.
- [251] Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* 2012;18:59–68. doi:10.1016/j.molmed.2011.07.010.
- [252] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science (80- )* 2012;334:1081–6. doi:10.1126/science.1209038.
- [253] Pagliassotti MJ, Kim PY, Estrada AL, Stewart CM, Gentile CL. Endoplasmic reticulum stress in obesity and obesity-related disorders: An expanded view. *Metabolism* 2016;65:1238–46. doi:10.1016/j.metabol.2016.05.002.
- [254] Lee A, Scapa E., Cohen D., Glimcher L. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 2008;302:1492–6. doi:10.1126/science.1158042.
- [255] Salvadó L, Palomer X, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:438–48. doi:10.1016/j.tem.2015.05.007.
- [256] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010;140:900–17. doi:10.1016/j.cell.2010.02.034.
- [257] Zhang X-Q, Xu C-F, Yu C-H, Chen W-X, Li Y-M. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:1768–76. doi:10.3748/wjg.v20.i7.1768.
- [258] Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, et al. GR 78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 2009;119:1201–15. doi:10.1172/JCI37007DS1.
- [259] Ning J, Hong T, Ward A, Pi J, Liu Z, Liu HY, et al. Constitutive role for IRE1-XBP1 signaling pathway in the insulin-mediated hepatic lipogenic program. *Endocrinology* 2011;152:2247–55. doi:10.1210/en.2010-1036.
- [260] Glimcher LH, Lee A. From sugar to fat: how the transcription factor XBP1 regulates hepatic lipogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2009;1173:E2–9. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04956.x.
- [261] So J, Hur KY, Tarrío M, Ruda V, Frank-kamenetsky M, Fitzgerald K, et al. Silencing of lipid metabolism genes through IRE1 $\alpha$ -mediated mRNA decay lowers plasma lipids in mice Jae-Seon. *Cell Metab* 2013;16:487–99. doi:10.1016/j.cmet.2012.09.004.
- [262] Jo H, Choe SS, Shin KC, Jang H, Lee JH, Seong JK, et al. Endoplasmic reticulum stress induces hepatic steatosis via increased expression of the hepatic very low-density lipoprotein receptor. *Hepatology* 2013;57:1366–77. doi:10.1002/hep.26126.
- [263] Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest* 2008;118:316–32. doi:10.1172/JCI32752.
- [264] Qiu W, Su Q, Rutledge AC, Zhang J, Adeli K. Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress attenuates apolipoprotein B100 synthesis via PERK signaling. *J Lipid Res* 2009;50:1814–23. doi:10.1194/jlr.M800343-JLR200.



- [265] Zhang W, Hietakangas V, Wee S, Lim SC, Gunaratne J, Cohen SM. ER stress potentiates insulin resistance through PERK-mediated FOXO phosphorylation. *Genes Dev* 2013;27:441–9. doi:10.1101/gad.201731.112.
- [266] Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D. Dephosphorylation of translation initiation factor 2 $\alpha$  enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell Metab* 2008;7:520–32. doi:10.1016/j.cmet.2008.04.011.
- [267] Zhou Y, Lee J, Reno CM, Sun C, Park SW, Chung J, et al. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1–FoxO1 interaction. *Nat Med* 2011;17:356–65. doi:10.1038/nm.2293.
- [268] Wang Y, Vera L, Fischer WH, Montminy M. The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature* 2009;460:534–7. doi:10.1038/nature08111.
- [269] Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A, Iwakoshi N, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306:457–61.
- [270] Özcan U, E Y, Özcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith R, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006;313:1137–40. doi:10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus.
- [271] Sun RQ, Wang H, Zeng XY, Chan SMH, Li SP, Jo E, et al. IRE1 impairs insulin signaling transduction of fructose-fed mice via JNK independent of excess lipid. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2015;1852:156–65. doi:10.1016/j.bbadis.2014.11.017.
- [272] Winnay J, Kahn C. Evaluation of the Unfolded Protein Response: PI 3-Kinase regulatory subunits as regulators of the IRE1 $\alpha$  pathway. *Methods Enzym* 2011;490:147–58. doi:10.1016/B978-0-12-385114-7.00009-X.
- [273] Flamment M, Hajduch E, Ferré P, Foufelle F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:381–90. doi:10.1016/j.tem.2012.06.003.
- [274] Lin GG, Scott JG. Activation of the Akt-NF- $\kappa$ B pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the Unfolded Protein Response. Yamazaki, H; Hiramatsu, N; Hayakawa, K; Tagawa, Y; Okamura, M; Ogata, R; Huang, T; Nakajima, S; Yao, J; Paton, AW; Paton, JC; Kitamura, M 2009;183:1480–7. doi:10.4049/jimmunol.0900017.
- [275] Deng J, Lu P, Zhang Y. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 2004;24:10161–8. doi:10.1128/MCB.24.23.10161-10168.2004.
- [276] Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000;287:664–6. doi:10.1126/science.287.5453.664.
- [277] Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol* 2015;7:719–41. doi:10.4330/wjc.v7.i11.719.
- [278] Sena CM, Pereira AM, Seíça R. Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2013;1832:2216–31. doi:10.1016/j.bbadis.2013.08.006.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [279] Cediél E, Vázquez-Cruz B, Navarro-Cid J, de las Heras N, Sanz-Rosa D, Cachofeiro V, et al. Role of endothelin-1 and thromboxane A2 in renal vasoconstriction induced by angiotensin II in diabetes and hypertension. *Kidney Int Suppl* 2002;62:S2-7. doi:10.1046/j.1523-1755.62.s82.2.x.
- [280] Konczalla J, Wanderer S, Mrosek J, Schuss P, Platz J, Güresir E, et al. Crosstalk between the angiotensin and endothelin-system in the cerebrovasculature. *Curr Neurovasc Res* 2013;10:335–45. doi:23988026.
- [281] Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol* 2009;196:193–222. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x.
- [282] Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord* 2013;14:5–12. doi:10.1007/s11154-012-9229-1.
- [283] Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:235–76. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121844.
- [284] Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:271–9. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.05.023.
- [285] Deng G, Long Y, Yu Y-R, Li M-R. Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS Pathway. *Int J Obes* 2010;34:165–71. doi:10.1038/ijo.2009.205.
- [286] Surks HK. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: A tale of two isoforms. *Circ Res* 2007;101:1078–80. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.165779.
- [287] Burgoyne JR, Eaton P. Oxidant sensing by protein kinases A and G enables integration of cell redox state with phosphoregulation. *Sensors* 2010;10:2731–51. doi:10.3390/s100402731.
- [288] Russo I, Del Mese P, Doronzo G, Mattiello L, Viretto M, Bosia A, et al. Resistance to the nitric oxide/cyclic guanosine 5'-monophosphate/protein kinase G pathway in vascular smooth muscle cells from the obese Zucker rat, a classical animal model of insulin resistance: role of oxidative stress. *Endocrinology* 2008;149:1480–9. doi:10.1210/en.2007-0920.
- [289] Schäfer A, Burkhardt M, Vollkommer T, Bauersachs J, Münzel T, Walter U, et al. Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta. *Biochem Pharmacol* 2003;65:397–405. doi:10.1016/S0006-2952(02)01523-X.
- [290] Glorian M, Isabelle L. The role of Cyclic 3'-5' adenosine monophosphate (cAMP) in differentiated and trans-differentiated vascular smooth muscle cells. In: Rezzani R, editor. *Curr. Trends Atherog.*, 2013, p. 121–46. doi:http://dx.doi.org/10.5772/54726.
- [291] Samarin S, Romero S, Kocks C, Didry D, Pantaloni D, Carlier MF. How VASP enhances actin-based motility. *J Cell Biol* 2003;163:131–42. doi:10.1083/jcb.200303191.
- [292] Joshi CN, Martin DN, Fox JC, Mendeleev NN, Brown TA, Tulis DA. The soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 inhibits vascular smooth muscle growth through the cAMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase pathways. *Pharmacology* 2011;339:394–402. doi:10.1124/jpet.111.183400.

- [293] Garland CJ, Hiley CR, Dora KA. EDHF: Spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol* 2011;164:839–52. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01148.x.
- [294] Wolin MS. Reactive oxygen species and the control of vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;539–49. doi:10.1152/ajpheart.01167.2008.
- [295] Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord* 2013;14:5–12. doi:10.1007/s11154-012-9229-1.
- [296] Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, et al. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2001;104:342–5. doi:10.1161/01.cir.104.3.342.
- [297] Kibbe M, Billiar T, Tzeng E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc Res* 1999;43:650–7.
- [298] Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004;75:639–53. doi:10.1016/j.lfs.2003.10.042.
- [299] Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, MacLeod KM. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H2144–52. doi:10.1152/ajpheart.00591.2005.
- [300] Shi Y, Vanhoutte PM. Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2008;154:639–51. doi:10.1038/bjp.2008.110.
- [301] Pannirselvam M, Wiehler WB, Anderson T, Triggle CR. Enhanced vascular reactivity of small mesenteric arteries from diabetic mice is associated with enhanced oxidative stress and cyclooxygenase products. *Br J Pharmacol* 2005;144:953–60. doi:10.1038/sj.bjp.0706121.
- [302] Cardillo C, Campia U, Bryant MB, Panza JA. Increased activity of endogenous endothelin in patients with type II diabetes mellitus. *Circulation* 2002;106:1783–7. doi:10.1161/01.CIR.0000032260.01569.64.
- [303] Chaney D. An overview of the first use of the terms cognition and behavior. *Behav Sci (Basel)* 2013;3:143–53. doi:10.3390/bs3010143.
- [304] Reed SK. *Cognition: theory and applications*. Thomson/Wadsworth; 2007.
- [305] Okano H, Hirano T, Balaban E. From the Academy Learning and memory. *Pnas* 2000;97:12403–4.
- [306] Stuchlik A. Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front Behav Neurosci* 2014;8:106. doi:10.3389/fnbeh.2014.00106.
- [307] Ismail FY, Fatemi SA, Johnston M V. Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. *Eur J Paediatr Neurol* 2017;21:23–48. doi:10.1016/j.ejpn.2016.07.007.
- [308] Kanoski SE, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav* 2011;103:59–68. doi:10.1016/j.physbeh.2010.12.003.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [309] Beilharz JE, Maniam J, Morris MJ. Diet-induced cognitive deficits: The role of fat and sugar, potential mechanisms and nutritional interventions. *Nutrients* 2015;7:6719–38. doi:10.3390/nu7085307.
- [310] Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult neurogenesis in the hippocampus: From stem cells to behavior. *Cell* 2016;167:897–914. doi:10.1016/j.cell.2016.10.021.
- [311] Harada CN, Love MCN, Triebel K. Normal Cognitive Aging. *Clin Geriatr Med* 2013;29:737–52. doi:10.1016/j.cger.2013.07.002.
- [312] Deary IJ, Corley J, Gow AJ, Harris SE, Houlihan LM, Marioni RE, et al. Age-associated cognitive decline. *Br Med Bull* 2009;92:135–52. doi:10.1093/bmb/ldp033.
- [313] Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild Cognitive impairment. Clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 1999;56:303–8.
- [314] Biessels GJ, Reagan LP. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. *Nature* 2015;16:660–71. doi:10.1038/nrn4019.
- [315] Bedse G, Di Domenico F, Serviddio G, Cassano T. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: Current knowledge. *Front Neurosci* 2015;9:1–13. doi:10.3389/fnins.2015.00204.
- [316] Kandimalla R, Thirumala V, Reddy PH. Is Alzheimer's disease a type 3 diabetes? A critical appraisal. *Biochim Biophys Acta* 2016;S0925-4439:30215–0. doi:10.1016/j.bbadis.2016.08.018.
- [317] Yang Y, Song W. Molecular links between Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neuroscience* 2013;250:140–50. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.07.009.
- [318] Barbagallo M, Dominguez LJ. Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *World J Diabetes* 2014;5:889–93. doi:10.4239/wjd.v5.i6.889.
- [319] Nguyen JCD, Killcross AS, Jenkins TA. Obesity and cognitive decline: Role of inflammation and vascular changes. *Front Neurosci* 2014;8:1–9. doi:10.3389/fnins.2014.00375.
- [320] Akomolafe A, Beiser A, Meigs JB, Au R, Green RC. Diabetes mellitus and risk of developing Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2006;63:1551–5. doi:10.1001/archneur.63.11.1551.
- [321] Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006;5:64–74. doi:10.1016/S1474-4422(05)70284-2.
- [322] Kopf D, Frölich L. Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: A systematic review of prospective trials. *J Alzheimer's Dis* 2009;16:677–85. doi:10.3233/JAD-2009-1011.
- [323] Lowette K, Roosen L, Tack J, Vanden Berghe P. Effects of high-fructose diets on central appetite signaling and cognitive function. *Front Nutr* 2015;2:5. doi:10.3389/fnut.2015.00005.
- [324] Ye X, Gao X, Scott T, Tucker KL. Habitual sugar intake and cognitive function among middle-aged and older Puerto Ricans without diabetes. *Br J Nutr* 2011;106:1423–32. doi:10.1017/S0007114511001760.

- [325] Papanikolaou Y, Palmer H, Binns MA, Jenkins DJA, Greenwood CE. Better cognitive performance following a low-glycaemic-index compared with a high-glycaemic-index carbohydrate meal in adults with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006;49:855–62. doi:10.1007/s00125-006-0183-x.
- [326] Benton D, Maconie A, Williams C. The influence of the glycaemic load of breakfast on the behaviour of children in school. *Physiol Behav* 2007;92:717–24. doi:10.1016/j.physbeh.2007.05.065.
- [327] Jurdak N, Kanarek RB. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiol Behav* 2009;96:1–5. doi:10.1016/j.physbeh.2008.07.023.
- [328] Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann R, Egan JM, et al. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 2009;18:1085–8. doi:10.1002/hipo.20470.
- [329] Agrawal R, Gomez-Pinilla F. “Metabolic syndrome” in the brain: deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. *J Physiol* 2012;590:2485–99. doi:10.1113/jphysiol.2012.230078.
- [330] Molteni R, Wu A, Vaynman S, Ying Z, Barnard RJ, Gómez-Pinilla F. Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 2004;123:429–40. doi:10.1016/j.neuroscience.2003.09.020.
- [331] Barrientos RM, Sprunger DB, Campeau S, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. BDNF mRNA expression in rat hippocampus following contextual learning is blocked by intrahippocampal IL-1 $\beta$  administration. *J Neuroimmunol* 2004;155:119–26. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.06.009.
- [332] Zhao W-Q, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol* 2004;490:71–81. doi:10.1016/j.ejphar.2004.02.045.
- [333] S. Roriz-Filho J, Sá-Roriz TM, Rosset I, Camozzato AL, Santos AC, Chaves MLF, et al. (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2009;1792:432–43. doi:10.1016/j.bbadis.2008.12.003.
- [334] Qiu WQ, Folstein MF. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid- $\beta$  peptide in Alzheimer’s disease: Review and hypothesis. *Neurobiol Aging* 2006;27:190–8. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.01.004.
- [335] Tang W-J. Targeting insulin-degrading enzyme to treat type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2015;27:24–34. doi:10.1016/j.tem.2015.11.003.
- [336] Zhao L. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: Implications for Alzheimer’s disease intervention. *J Neurosci* 2004;24:11120–6. doi:10.1523/JNEUROSCI.2860-04.2004.
- [337] Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, Zhao Z, et al. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *FASEB J* 2004;18:902–4. doi:10.1096/fj.03-0978fje.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [338] Sun J, Xia W, Cai R, Wang P, Huang R, Sun H, et al. Serum insulin degrading enzyme level and other factors in type 2 diabetic patients with mild cognitive impairment. *Curr Alzheimer Res* 2016;13:1337–45. doi:10.2174/1567205013666160615091043.
- [339] Craft S, Newcomer J, Kanne S, Dagogo-Jack S, Cryer P, Sheline Y, et al. Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996;17:123–30.
- [340] Mielke JG, Taghibiglou C, Liu L, Zhang Y, Jia Z, Adeli K, et al. A biochemical and functional characterization of diet-induced brain insulin resistance. *J Neurochem* 2005;93:1568–78. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03155.x.
- [341] Wu H-W, Ren L-F, Zhou X, Han D-W. A high-fructose diet induces hippocampal insulin resistance and exacerbates memory deficits in male Sprague-Dawley rats. *Nutr Neurosci* 2014;18:323–8. doi:10.1179/1476830514Y.0000000133.
- [342] Freeman L, Haley-Zitlin V, Rosengerger D, Granholm A. Damaging effects of a high-fat diet to the brain and cognition: A review of proposed mechanisms. *Nutr Neurosci* 2014;17:241–51. doi:10.1179/1476830513Y.0000000092.
- [343] Gibertini M. IL1 beta impairs relational but not procedural rodent learning in a water maze task. *Adv Exp Med Biol* 1996;402:207–17.
- [344] Gibertini M, Newton C, Friedman H, Klein TW. Spatial learning impairment in mice infected with legionella pneumophila or administered exogenous interleukin-1- $\beta$ . *Brain Behav Immun* 1995;9:113–28. doi:10.1006/brbi.1995.1012.
- [345] Yaffe K, Kanaya A, Lindquist K, Simonsick EM, Harris T, Shorr RI, et al. The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline. *Jama* 2004;292:2237–42. doi:10.1001/jama.292.18.2237.
- [346] Calvo-Ochoa E, Hernández-Ortega K, Ferrera P, Morimoto S, Arias C. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014;34:1001–8. doi:10.1038/jcbfm.2014.48.
- [347] Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, et al. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol* 2010;219:25–32. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.11.010.
- [348] Yin QQ, Pei JJ, Xu S, Luo DZ, Dong SQ, Sun MH, et al. Pioglitazone improves cognitive function via increasing insulin sensitivity and strengthening antioxidant defense system in fructose-drinking insulin resistance rats. *PLoS One* 2013;8:e59313. doi:10.1371/journal.pone.0059313.
- [349] Pérez-Matute P, Zulet MA, Martínez JA. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:771–9. doi:10.1016/j.coph.2009.08.005.
- [350] Woltjer RL, Maezawa I, Ou JJ, Montine KS, Montine TJ. Advanced glycation endproduct precursor alters intracellular amyloid-beta/A beta PP carboxy-terminal fragment aggregation and cytotoxicity. *J Alzheimer's Dis* 2003;5:467–76.

- [351] Kuhla B, Haase C, Flach K, Lüth HJ, Arendt T, Münch G. Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. *J Biol Chem* 2007;282:6984–91. doi:10.1074/jbc.M609521200.
- [352] Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 2004;19:1699–707. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03246.x.
- [353] Alzoubi KH, Khabour OF, Salah HA, Hasan Z. Vitamin E prevents high-fat high-carbohydrates diet-induced memory impairment: The role of oxidative stress. *Physiol Behav* 2013;119:72–8. doi:10.1016/j.physbeh.2013.06.011.
- [354] Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821–1830. doi:10.1172/JCI19451.
- [355] Golpich M, Amini E, Mohamed Z, Azman Ali R, Mohamed Ibrahim N, Ahmadiani A. Mitochondrial dysfunction and biogenesis in neurodegenerative diseases: Pathogenesis and treatment. *CNS Neurosci Ther* 2016;1–18. doi:10.1111/cns.12655.
- [356] Putti R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Front Physiol* 2015;6:1–7. doi:10.3389/fphys.2015.00109.
- [357] Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2012;1817:1833–8. doi:10.1016/j.bbabi.2012.02.033.
- [358] Han XJ, Tomizawa K, Fujimura A, Ohmori I, Nishiki T, Matsushita M, et al. Regulation of mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Acta Med Okayama* 2011;65:1–10.
- [359] Zhu X, Perry G, Smith M, Wang X. Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2013;33:S253–62. doi:10.3233/JAD-2012-129005.
- [360] Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 2009;18:169–76. doi:10.1093/hmg/ddp326.
- [361] Manczak M, Calkins MJ, Reddy PH. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: Implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet* 2011;20:2495–509. doi:10.1093/hmg/ddr139.
- [362] Wang X, Su B, Lee H, Li X, Perry G, Smith M a, et al. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2009;29:9090–103. doi:10.1523/JNEUROSCI.1357-09.2009.
- [363] Hagberg H, Mallard C, Rousset CI, Thornton C. Mitochondria: Hub of injury responses in the developing brain. *Lancet Neurol* 2014;13:217–32. doi:10.1016/S1474-4422(13)70261-8.
- [364] Wang X, Wang W, Perry G, Lee H, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:1240–7. doi:10.1016/j.bbadis.2013.10.015.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [365] Sheng B, Wang X, Su B, Lee H, Casadesus G, Perry G, et al. Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2012;120:419–29. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07581.x.
- [366] Austin S, St-Pierre J. PGC1 $\alpha$  and mitochondrial metabolism - emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci* 2012;125:4963–71. doi:10.1242/jcs.113662.
- [367] Qin W, Harountunian V, Katsel P, Cardozo CP, Buxbaum JD, Pasinetti GM. PGC-1 $\alpha$  expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Arch Neurol* 2009;66:352–61. doi:10.1001/archneurol.2008.588.
- [368] Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta* 2016;S0925-4439:30292–7. doi:10.1016/j.bbadis.2016.11.010.
- [369] Jheng H-F, Tsai P-J, Guo S-M, Kuo L-H, Chang C-RC-S, Su I-J, et al. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 2012;32:309–19. doi:10.1128/MCB.05603-11.
- [370] Holmström MH, Iglesias-Gutierrez E, Zierath JR, Garcia-Roves PM. Tissue-specific control of mitochondrial respiration in obesity-related insulin resistance and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302:E731-739. doi:10.1152/ajpendo.00159.2011.
- [371] Petrov D, Pedrós I, Artiach G, Sureda FX, Barroso E, Pallàs M, et al. High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2015;1852:1687–99. doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.004.
- [372] Pintana H, Apaijai N, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. *Life Sci* 2012;91:409–14. doi:10.1016/j.lfs.2012.08.017.
- [373] Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: Structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006;1:223–36. doi:10.1007/s11481-006-9025-3.
- [374] Wang H, Golob EJ, Su MY. Vascular volume and blood-brain barrier permeability measured by dynamic contrast enhanced MRI in hippocampus and cerebellum of patients with MCI and normal controls. *J Magn Reson Imaging* 2006;24:695–700. doi:10.1002/jmri.20669.
- [375] Bowman GL, Kaye JA, Moore M, Waichunas D, Carlson NE, Quinn JF. Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease: Stability and functional significance. *Neurology* 2007;68:1809–14. doi:10.1212/01.wnl.0000262031.18018.1a.
- [376] Freeman LR, Granholm A-CE. Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012;32:643–53. doi:10.1038/jcbfm.2011.168.
- [377] Hargrave SL, Davidson TL, Zheng W, Kinzig KP. Western diets induce blood-brain barrier leakage and alter spatial strategies in rats. *Behav Neurosci* 2016;130:123–35. doi:10.1037/bne0000110.



- [378] Kanoski SE, Zhang Y, Zheng W, Davidson TL. The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. *J Alzheimer's Dis* 2010;21:207–19. doi:10.3233/JAD-2010-091414.
- [379] Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoka R, et al. Triglycerides induce leptin resistance at the blood brain barrier. *Diabetes* 2004;53:1253–60. doi:10.2337/diabetes.53.5.1253.
- [380] Banks W a, Burney BO, Robinson SM. Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier. *Peptides* 2008;29:2061–5. doi:10.1016/j.peptides.2008.07.001.
- [381] McGregor G, Malekizadeh Y, Harvey J. Food for thought: regulation of synaptic function by metabolic hormones. *Mol Endocrinol* 2015;29:3–13. doi:10.1210/me.2014-1328.
- [382] Grillo CA, Piroli GG, Junor L, Wilson SP, Mott DD, Wilson MA, et al. Obesity/hyperleptinemic phenotype impairs structural and functional plasticity in the rat hippocampus. *Physiol Behav* 2011;105:138–44. doi:10.1016/j.physbeh.2011.02.028.
- [383] Proctor C, Thiennimitr P, Chattipakorn N. Diet, gut microbiota and cognition. *Metab Brain Dis* 2017;32:1–17. doi:10.1007/s11011-016-9917-8.
- [384] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National A. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. doi:10.17226/12910.
- [385] Vorhees C V, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006;1:848–58. doi:10.1038/nprot.2006.116.
- [386] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 2012;13:93–110. doi:10.1007/s10339-011-0430-z.
- [387] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8:871–4. doi:10.1016/0019-2791(71)90454-X.
- [388] Qu S, Su D, Altomonte J, Kamagate A, He J, Tse T, et al. PPAR $\alpha$  mediates the hypolipidemic action of fibrates by antagonizing FoxO1. *Am J Physiol* 2009;292. doi:10.1152/ajpendo.00157.2006.
- [389] Lazarow PB. Assay of peroxisomal  $\beta$ -oxidation of fatty acids. *Methods Enzym* 1981;72:315–9.
- [390] Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harb Protoc* 2008;3:3–5. doi:10.1101/pdb.prot4986.
- [391] Parlee SD, Lentz SI, Mori H, MacDougal OA. Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. *Methods Enzym* 2014;537:93–122. doi:10.1016/B978-0-12-411619-1.00006-9.
- [392] Masson P. Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique. *J Tech Methods* 1929;12:75.
- [393] Levene AP, Kudo H, Armstrong MJ, Thursz MR, Gedroyc WM, Anstee QM, et al. Quantifying hepatic steatosis - more than meets the eye. *Histopathology* 2012;60:971–81. doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04193.x.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [394] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [395] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [396] Belfiore F, Iannello S, Volpicelli G. Insulin sensitivity indices calculated from basal and OGTT-induced insulin, glucose, and FFA levels. *Mol Genet Metab* 1998;63:134–41. doi:10.1006/mgme.1997.2658.
- [397] Lakhan S, Kirchgessner A. The emerging role of dietary fructose in obesity and cognitive decline. *Nutr J* 2013;12:1–12. doi:10.1186/1475-2891-12-114.
- [398] Bursać BN, Djordjevic AD, Vasiljević AD, Milutinović DDV, Veličković N a, Nestorović NM, et al. Fructose consumption enhances glucocorticoid action in rat visceral adipose tissue. *J Nutr Biochem* 2013;24:1166–72. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.09.002.
- [399] Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR, Sahrudin NN, Rafizul M, Yusof M, et al. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *Biomed Res Int* 2014;2014:263897. doi:10.1155/2014/263897.
- [400] Light HR, Tsanzi E, Gigliotti J, Morgan K, Tou JC. The type of caloric sweetener added to water influences weight gain, fat mass, and reproduction in growing Sprague-Dawley female rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009;234:651–61. doi:10.3181/0812-RM-368.
- [401] Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1023–33. doi:10.1210/jc.2006-1055.
- [402] Rosa A De, Capasso M, Forestieri P, Pilone V, Nardelli C, Buono P, et al. Adiponectin oligomers as potential indicators of adipose tissue improvement in obese subjects. *Eur J Endocrinol* 2013;169:37–43. doi:10.1530/EJE-12-1039.
- [403] Daniele A, Cammarata R, Masullo M, Nerone G, Finamore F, Andrea MD, et al. Analysis of adiponectin gene and comparison of its expression in two different pig breeds. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:1869–74. doi:10.1038/oby.2008.275.
- [404] Rezvani R, Cianflone K, McGahan JP, Berglund L, Bremer AA, Keim NL, et al. Effects of sugar-sweetened beverages on plasma acylation stimulating protein, leptin and adiponectin: relationships with metabolic outcomes. *Obesity* 2013;21:2471–80. doi:10.1002/oby.20437.
- [405] Koo HY, Miyashita M, Simon Cho BH, Nakamura MT. Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:285–9. doi:10.1016/j.bbrc.2009.09.109.
- [406] Agius L. High-carbohydrate diets induce hepatic insulin resistance to protect the liver from substrate overload. *Biochem Pharmacol* 2013;85:306–12. doi:10.1016/j.bcp.2012.09.019.
- [407] Xu X, So J-S, Park J-G, Lee A-H. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin Liver Dis* 2013;33:301–11. doi:10.1055/s-0033-1358523.
- [408] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003;423:762–9. doi:10.1038/nature01705.

- [409] Taghibiglou C, Iderstine SC Van, Chen B, Rudy D, Aiton A, Lewis GF, et al. Mechanisms of Hepatic Very Low Density Lipoprotein. *J Biol Chem* 2000;275:8416–25.
- [410] Babacanoglu C, Yildirim N, Sadi G, Pektas MB, Akar F. Resveratrol prevents high-fructose corn syrup-induced vascular insulin resistance and dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* 2013;60:160–7. doi:10.1016/j.fct.2013.07.026.
- [411] Mahmoud MF, El-Nagar M, El-Bassossy HM. Anti-inflammatory effect of atorvastatin on vascular reactivity and insulin resistance in fructose fed rats. *Arch Pharm Res* 2012;35:155–62. doi:10.1007/s12272-012-0117-8.
- [412] Navarro-Cid J, Maeso R, Perez-Vizcaino F, Cachofeiro V, Ruilope LM, Tamargo J, et al. Effects of losartan on blood pressure, metabolic alterations, and vascular reactivity in the fructose-induced hypertensive rat. *Hypertension* 1995;26:1074–8.
- [413] Iyer SN, Katovich MJ. Vascular reactivity to phenylephrine and angiotensin II in hypertensive rats associated with insulin resistance. *Clin Exp Hypertens* 1996;18:227–42.
- [414] Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2563–8. doi:10.1210/jc.2004-0518.
- [415] Vaiopoulos AG, Marinou K, Christodoulides C, Koutsilieris M. The role of adiponectin in human vascular physiology. *Int J Cardiol* 2012;155:188–93. doi:10.1016/j.ijcard.2011.07.047.
- [416] Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:45021–6. doi:10.1074/jbc.M307878200.
- [417] Fernández-Real J-M, Castro A, Vázquez G, Casamitjana R, López-Bermejo A, Peñarroja G, et al. Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2004;27:739–45.
- [418] Mourmoura E, Vial G, Laillet B, Rigaudière J-P, Hiningier-Favier I, Dubouchaud H, et al. Preserved endothelium-dependent dilatation of the coronary microvasculature at the early phase of diabetes mellitus despite the increased oxidative stress and depressed cardiac mechanical function ex vivo. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:49. doi:10.1186/1475-2840-12-49.
- [419] Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation* 1996;94:3341–3347.
- [420] Shi Y, Ku DD, Man RYK, Vanhoutte PM. Augmented endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxations attenuate endothelial dysfunction in femoral and mesenteric, but not in carotid arteries from type I diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318:276–81. doi:10.1124/jpet.105.099739.
- [421] Han X, Zhang R, Anderson L, Rahimian R. Sexual dimorphism in rat aortic endothelial function of streptozotocin-induced diabetes: Possible involvement of superoxide and nitric oxide production. *Eur J Pharmacol* 2014;723:442–50. doi:10.1016/j.ejphar.2013.10.052.
- [422] Aszódi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, et al. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J* 1999;18:37–48. doi:10.1093/emboj/18.1.37.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [423] Yousif MH, Oriowo MA, Williams KI. Sodium nitroprusside-induced cGMP independent vasodilator responses in the perfused rabbit ovarian vascular bed. *Pharmacol Res* 1998;38:381–6.
- [424] Bezerra RM, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CR, Saad MJ. A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J Nutr* 2000;130:1531–5.
- [425] Balakumar M, Raji L, Prabhu D, Sathishkumar C, Prabu P, Mohan V, et al. High-fructose diet is as detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum (ER) stress. *Mol Cell Biochem* 2016;423:93–104. doi:10.1007/s11010-016-2828-5.
- [426] Huang B-W, Chiang M-T, Yao H-T, Chiang W. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab* 2004;6:120–6.
- [427] Baena M, Sangüesa G, Hutter N, Beltrán JM, Sánchez RM, Roglans N, et al. Liquid fructose in Western-diet-fed mice impairs liver insulin signaling and causes cholesterol and triglyceride loading without changing calorie intake and body weight. *J Nutr Biochem* 2017;40:105–15. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.10.015.
- [428] Chakrabarti P, Kandror K V. The role of mTOR in lipid homeostasis and diabetes progression. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2015;22:340–6. doi:10.1097/MED.000000000000187.
- [429] Howell JJ, Hellberg K, Turner M, Talbott G, Kolar MJ, Ross DS, et al. Metformin inhibits hepatic mTORC1 signaling via dose-dependent mechanisms involving AMPK and the TSC Complex. *Cell Metab* 2017. doi:10.1016/j.cmet.2016.12.009.
- [430] Caron A, Richard D, Laplante M. The roles of mTOR complexes in lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 2015;35:321–48. doi:10.1146/annurev-nutr-071714-034355.
- [431] Yue Y, Wang Y, Li D, Song Z, Jiao H, Lin H. A central role for the mammalian target of rapamycin in LPS-induced anorexia in mice. *J Endocrinol* 2015;224:37–47. doi:10.1530/JOE-14-0523.
- [432] Takano A, Usui I, Haruta T, Kawahara J, Uno T, Iwata M, et al. Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Mol Cell Biol* 2001;21:5050–62. doi:10.1128/MCB.21.15.5050-5062.2001.
- [433] Li P, Koike T, Qin B, Kubota M, Kawata Y, Jia YJ, et al. A high-fructose diet impairs Akt and PKCzeta phosphorylation and GLUT4 translocation in rat skeletal muscle. *Horm Metab Res* 2008;40:528–32. doi:10.1055/s-2008-1073162.
- [434] Ishimoto T, Lanaspa MA, Le MT, Garcia GE, Diggie CP, Maclean PS, et al. Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Pnas* 2012;109:4320–5. doi:10.1073/pnas.1119908109.
- [435] Panserat S, Rideau N, Polakof S. Nutritional regulation of glucokinase: a cross-species story. *Nutr Res Rev* 2014;27:21–47. doi:10.1017/S0954422414000018.
- [436] Stavric B, Johnson WJ, Clayman S, Gadd RE, Chartrand A. Effect of fructose administration on serum urate levels in the uricase inhibited rat. *Experientia* 1976;32:373–4.

- [437] Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Liverini G, Iossa S. Increased hepatic de novo lipogenesis and mitochondrial efficiency in a model of obesity induced by diets rich in fructose. *Eur J Nutr* 2013;52:537–45. doi:10.1007/s00394-012-0356-y.
- [438] Hodson L, Fielding BA. Stearoyl-CoA desaturase: Rogue or innocent bystander? *Prog Lipid Res* 2013;52:15–42. doi:10.1016/j.plipres.2012.08.002.
- [439] Yu J, Deng R, Zhu HH, Zhang SS, Zhu C, Montminy M, et al. Modulation of fatty acid synthase degradation by concerted action of p38 MAP kinase, E3 ligase COP1, and SH2-tyrosine phosphatase Shp2. *J Biol Chem* 2013;288:3823–30. doi:10.1074/jbc.M112.397885.
- [440] Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Alex I, et al. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab* 2013;14:21–32. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.002.Akt.
- [441] Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3441–6. doi:10.1073/pnas.0914798107.
- [442] Owen JL, Zhang Y, Bae S-H, Farooqi MS, Liang G, Hammer RE, et al. Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:16184–9. doi:10.1073/pnas.1213343109.
- [443] Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 2001;107:1263–73. doi:10.1172/JCI11596.
- [444] Li Y, Xu S, Mihaylova M, Zheng B, Hou X, Jiang B, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin resistant mice. *Cell Metab* 2011;13:376–88. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.009.
- [445] Pfaffenbach KT, Nivala AM, Reese L, Ellis F, Wang D, Wei Y, et al. Rapamycin inhibits postprandial-mediated X-box-binding protein-1 splicing in rat liver. *J Nutr* 2010;140:879–84. doi:10.3945/jn.109.119883.
- [446] Kim K, Pyo S, Um SH. S6 kinase 2 deficiency enhances ketone body production and increases peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in the liver. *Hepatology* 2012;55:1727–37. doi:10.1002/hep.25537.
- [447] Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, et al. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  regulatory pathway. *Cell Metab* 2006;4:199–210. doi:10.1016/j.cmet.2006.08.005.
- [448] Louet J, Chatelain F, Decaux J, Park EA, Kohl C, Pineau T, et al. Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ )-independent pathway. *Biochem J* 2001;354:189–97.
- [449] Sundaram M, Zhong S, Bou Khalil M, Links PH, Zhao Y, Iqbal J, et al. Expression of apolipoprotein C-III in McA-RH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions. *J Lipid Res* 2010;51:150–61. doi:10.1194/M900346-JLR200.
- [450] Norata GD, Tsimikas S, Pirillo A, Catapano AL. Apolipoprotein C-III: from pathophysiology to pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2015;36:675–87. doi:10.1016/j.tips.2015.07.001.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [451] Cohn JS, Patterson BW, Uffelman KD, Davignon J, Steiner G. Rate of production of plasma and Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL) apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of production of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3949–55. doi:10.1210/jc.2003-032056.
- [452] Ito Y, Azrolan N, Connell AO, Walsh A, Breslow JL. Hypertriglyceridemia as a result of human Apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science* 1990;249:790–3.
- [453] Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med* 2014;371:32–41. doi:10.1056/NEJMoa1308027.
- [454] Taskinen M-R, Borén J. Why is Apolipoprotein CIII emerging as a novel therapeutic target to reduce the burden of cardiovascular disease? *Curr Atheroscler Rep* 2016;18:59. doi:10.1007/s11883-016-0614-1.
- [455] Rodrigues AH, Moreira CCL, Mario ÉG, de Souza Cordeiro LM, Avelar GF, Botion LM, et al. Differential modulation of cytosolic lipases activities in liver and adipose tissue by high-carbohydrate diets. *Endocrine* 2016;53:423–32. doi:10.1007/s12020-016-0886-9.
- [456] Uno K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Hasegawa Y, Sawada S, et al. A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signalling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals. *Nat Commun* 2015;6:7940. doi:10.1038/ncomms8940.
- [457] Gao Y, Shen W, Lu B, Zhang Q, Hu Y, Chen Y. Upregulation of hepatic VLDLR via PPAR $\alpha$  is required for the triglyceride-lowering effect of fenofibrate. *J Lipid Res* 2014;55:1622–33. doi:10.1194/jlr.M041988.
- [458] Kenerson HL, Subramanian S, McIntyre R, Kazami M, Yeung RS. Livers with constitutive mTORC1 activity resist steatosis independent of feedback suppression of akt. *PLoS One* 2015;10:1–17. doi:10.1371/journal.pone.0117000.
- [459] Kenerson HL, Yeh MM, Yeung RS. Tuberous sclerosis complex-1 deficiency attenuates diet-induced hepatic lipid accumulation. *PLoS One* 2011;6:e18075. doi:10.1371/journal.pone.0018075.
- [460] Zhang K, Wang S, Malhotra J, Hassler JR, Back SH, Wang G, et al. The unfolded protein response transducer IRE1 $\alpha$  prevents ER stress-induced hepatic steatosis. *Embo J* 2011;30:1357–75. doi:emboj201152 [pii]\r10.1038/emboj.2011.52.
- [461] Kato H, Nakajima S, Saito Y, Takahashi S, Katoh R, Kitamura M. mTORC1 serves ER stress-triggered apoptosis via selective activation of the IRE1–JNK pathway. *Cell Death Differ* 2012;19:310–20. doi:10.1038/cdd.2011.98.
- [462] Alzamendi A, Giovambattista A, García ME, Rebolledo OR, Gagliardino JJ, Spinedi E. Effect of pioglitazone on the fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. *PPAR Res* 2012;2012:259093. doi:10.1155/2012/259093.
- [463] Alwahsh SM, Gebhardt R. Dietary fructose as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Arch Toxicol* 2016. doi:10.1007/s00204-016-1892-7.
- [464] Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, et al. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J Nutr* 2009;139:2067–71. doi:10.3945/jn.109.105858.

- [465] Kelany ME, Hakami TM, Omar AH. Curcumin improves the metabolic syndrome in high-fructose-diet-fed rats: role of TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, and oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol* 2017;95:140–50. doi:10.1139/cjpp-2016-0152.
- [466] Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with NAFLD. *Hepatology* 2010;51:1961–71. doi:10.1002/hep.23535.
- [467] Silbernagel G, Machann J, Häring H-U, Fritsche A, Peter A. Plasminogen activator inhibitor-1, monocyte chemoattractant protein-1, e-selectin and C-reactive protein levels in response to 4-week very-high-fructose or -glucose diets. *Eur J Clin Nutr* 2014;68:97–100. doi:10.1038/ejcn.2013.228.
- [468] Ren LP, Chan SMH, Zeng XY, Laybutt DR, Iseli TJ, Sun RQ, et al. Differing endoplasmic reticulum stress response to excess lipogenesis versus lipid oversupply in relation to hepatic steatosis and insulin resistance. *PLoS One* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0030816.
- [469] Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 $\alpha$  and XBP1. *Dev Cell* 2007;13:365–76. doi:10.1016/j.devcel.2007.07.018.
- [470] Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 2016;529:326–35. doi:10.1038/nature17041.
- [471] DuRose J, Tam A, Niwa M. Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 2006;17:3095–107. doi:10.1091/mbc.E06-01-0055.
- [472] Appenzeller-Herzog C, Hall MN. Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Trends Cell Biol* 2012;22:274–82. doi:10.1016/j.tcb.2012.02.006.
- [473] Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. ATF6 $\alpha$ -Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10519–24. doi:10.1073/pnas.0800939105.
- [474] Stollery B, Christian L. Glucose improves object-location binding in visual-spatial working memory. *Psychopharmacology (Berl)* 2016;233:529–47. doi:10.1007/s00213-015-4125-5.
- [475] Messier C, White NM. Memory improvement by glucose, fructose, and two glucose analogs: a possible effect on peripheral glucose transport. *Behav Neural Biol* 1987;48:104–27.
- [476] Messier C. Glucose improvement of memory: A review. *Eur J Pharmacol* 2004;490:33–57. doi:10.1016/j.ejphar.2004.02.043.
- [477] Bruggeman EC, Li C, Ross AP, Doherty JM, Williams BF, Frantz KJ, et al. A high fructose diet does not affect amphetamine self-administration or spatial water maze learning and memory in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;99:356–64. doi:10.1016/j.pbb.2011.05.014.
- [478] Cohen SJ, Stackman RW. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav Brain Res* 2015;285:105–17. doi:10.1016/j.bbr.2014.08.002.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

- [479] Brown MW, Barker GRI, Aggleton JP, Warburton EC. What pharmacological interventions indicate concerning the role of the perirhinal cortex in recognition memory. *Neuropsychologia* 2012;50:3122–40. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2012.07.034.
- [480] White CL, Pistell PJ, Purpera MN, Gupta S, Hise TL, Keller JN, et al. Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats: Contributions of maternal diet. *Neurobiol Dis* 2009;35:3–13. doi:10.1016/j.nbd.2009.04.002.
- [481] Liu Z, Sun Y, Qiao Q, Zhao T, Zhang W, Ren B, et al. Sesamol ameliorates high-fat and high-fructose induced cognitive defects via improving insulin signaling disruption in central nervous system. *Food Funct* 2017. doi:10.1039/C6FO01562J.
- [482] Kang S, Kim CH, Jung H, Kim E, Song HT, Lee JE. Agmatine ameliorates type 2 diabetes induced-Alzheimer's disease-like alterations in high-fat diet-fed mice via reactivation of blunted insulin signalling. *Neuropharmacology* 2017;113:467–79. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.10.029.
- [483] Vassar R, Kuhn P, Haass C, Kennedy M, Rajendran L, Wong P, et al. Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. *J Neurochem* 2014;130:4–28. doi:10.1111/jnc.12715.
- [484] Hsu TM, Konanur VR, Taing L, Usui R, Kayser BD, Goran MI, et al. Effects of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats. *Hippocampus* 2014;0:1–13. doi:10.1002/hipo.22368.
- [485] Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009;16:763–74. doi:10.3233/JAD-2009-1013.
- [486] Gugliucci A. Formation of fructose-mediated advanced glycation end products and their roles in metabolic and inflammatory diseases. *Adv Nutr* 2017;8:54–62. doi:10.3945/an.116.013912.
- [487] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752–61. doi:10.1172/JCI21625.
- [488] Wang D, Yan J, Chen J, Wu W, Zhu X, Wang Y. Naringin improves neuronal insulin signaling, brain mitochondrial function, and cognitive function in high-fat diet-induced obese mice. *Cell Mol Neurobiol* 2015;35:1061–71. doi:10.1007/s10571-015-0201-y.
- [489] Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006;443:787–95. doi:10.1038/nature05292.
- [490] Drew PA, Smith E, Thomas PD, Armin J, Grant RT, Barzo P, et al. Fat distribution and changes in the blood brain barrier in a rat model of cerebral arterial fat embolism. *J Neurol Sci* 1998;156:138–43. doi:10.1016/S0022-510X(98)00039-2.
- [491] Farr SA, Yamada KA, Butterfield DA, Abdul HM, Xu L, Miller NE, et al. Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* 2008;149:2628–36. doi:10.1210/en.2007-1722.



- [492] Ng RC-L, Cheng O-Y, Jian M, Kwan JS-C, Ho PW-L, Cheng KK-Y, et al. Chronic adiponectin deficiency leads to Alzheimer's disease-like cognitive impairments and pathologies through AMPK inactivation and cerebral insulin resistance in aged mice. *Mol Neurodegener* 2016;11:71. doi:10.1186/s13024-016-0136-x.
- [493] Galipeau D, Verma S, McNeill JH. Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2478-84. doi:10.1152/ajpheart.00243.2002.



## **IX. ANNEX**



RESEARCH ARTICLE | *Metabolism, Cell Signaling, and Disease*

Type of supplemented simple sugar, not merely calorie intake, determines adverse effects on metabolism and aortic function in female rats

Gemma Sangüesa,<sup>1\*</sup> Sonali Shaligram,<sup>2\*</sup> Farjana Akther,<sup>2</sup> Núria Roglans,<sup>1,3,4</sup> Juan C. Laguna,<sup>1,3,4</sup> Roshanak Rahimian,<sup>2\*</sup> and Marta Alegret<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Physiology & Pharmacology, Thomas J. Long School of Pharmacy & Health Sciences, University of the Pacific, Stockton, California; <sup>3</sup>Institute of Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain; and <sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Madrid, Spain

Submitted 4 May 2016; accepted in final form 7 November 2016

**Sangüesa G, Shaligram S, Akther F, Roglans N, Laguna JC, Rahimian R, Alegret M.** Type of supplemented simple sugar, not merely calorie intake, determines adverse effects on metabolism and aortic function in female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 312: H289–H304, 2017. First published December 6, 2016; doi:10.1152/ajpheart.00339.2016.—High consumption of simple sugars causes adverse cardiometabolic effects. We investigated the mechanisms underlying the metabolic and vascular effects of glucose or fructose intake and determined whether these effects are exclusively related to increased calorie consumption. Female Sprague-Dawley rats were supplemented with 20% wt/vol glucose or fructose for 2 mo, and plasma analytes and aortic response to vasodilator and vasoconstrictor agents were determined. Expression of molecules associated with lipid metabolism, insulin signaling, and vascular response were evaluated in hepatic and/or aortic tissues. Caloric intake was increased in both sugar-supplemented groups vs. control and in glucose- vs. fructose-supplemented rats. Hepatic lipogenesis was induced in both groups. Plasma triglycerides were increased only in the fructose group, together with decreased expression of carnitine palmitoyltransferase-1A and increased microsomal triglyceride transfer protein expression in the liver. Plasma adiponectin and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\alpha$  expression was increased only by glucose supplementation. Insulin signaling in liver and aorta was impaired in both sugar-supplemented groups, but the effect was more pronounced in the fructose group. Fructose supplementation attenuated aortic relaxation response to a nitric oxide (NO) donor, whereas glucose potentiated it. Phenylephrine-induced maximal contractions were reduced in the glucose group, which could be related to increased endothelial NO synthase (eNOS) phosphorylation and subsequent elevated basal NO in the glucose group. In conclusion, despite higher caloric intake in glucose-supplemented rats, fructose caused worse metabolic and vascular responses. This may be because of the elevated adiponectin level and the subsequent enhancement of PPAR $\alpha$  and eNOS phosphorylation in glucose-supplemented rats.

**NEW & NOTEWORTHY** This is the first study comparing the effects of glucose and fructose consumption on metabolic factors and aortic function in female rats. Our results show that, although total caloric consumption was higher in glucose-supplemented rats, fructose ingestion had a greater impact in inducing metabolic and aortic dysfunction.

\* G. Sangüesa and S. Shaligram contributed equally to this study, and R. Rahimian and M. Alegret contributed equally to this study.

Address for reprint requests and other correspondence: M. Alegret, Dept. of Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain (e-mail: alegret@ub.edu).

fructose; glucose; liver; insulin resistance; adiponectin

INSULIN RESISTANCE, OBESITY, and type 2 diabetes are metabolic disturbances leading to cardiovascular diseases (CVD). CVD are main causes of morbidity and mortality in diabetes, and both micro- and macrovascular complications are thought to play a major role in the development of CVD in prediabetic and diabetic patients (14, 30).

In humans, an excessive intake of added sugars has been linked to the development of metabolic disturbances (22, 39) and therefore to an increase in the risk for CVD mortality (59). Despite the evidence generated from epidemiological studies, the molecular mechanisms linking diabetes and CVD in the population with excessive sugar intake are not fully understood. At the vascular level, insulin resistance (32, 34) along with dyslipidemia, local inflammation, and a decrease in the synthesis of endothelium-derived relaxation factors such as nitric oxide (NO) may play a key role in the development of CVD (25).

The adverse cardiometabolic effects of simple sugars seem to be worse when they are ingested in liquid than in solid form because the level of food intake is not reduced enough to compensate the extra calories provided by beverages (53), leading to an increase in total caloric intake. Consumption of simple sugars in liquid form essentially occurs as sugar-sweetened beverages (SSB), which include sodas, colas, fruit punches, lemonade, and other fruit drinks with added sugars. The main compounds used by the food industry to sweeten these beverages are high-fructose corn syrup (in the United States) and sucrose (in Europe), both containing approximately equal amounts of fructose and glucose (48). At present, there is an intense debate in the scientific community about whether the adverse cardiovascular and metabolic effects of SSB are mostly attributable to specific effects of the simple sugars used as sweeteners or are merely the consequence of the increase in caloric intake and weight gain in the population consuming large quantities of SSB (10, 26, 49, 52).

To study the effects of simple sugar consumption in liquid form on glucose and lipid metabolism, the rat is a good model that has been used extensively by us (7, 41–43, 54–56). In previous studies, we showed that female rats supplemented for short periods of time (14 days) with liquid fructose displayed a more detrimental response than male rats. Specifically, we

reported that fructose induced hypertriglyceridemia and fatty liver in both sexes, but only females showed glucose intolerance and hepatic insulin resistance (41, 56). Insulin resistance is a prominent feature of metabolic diseases such as obesity or type 2 diabetes mellitus, which is also a major risk factor for CVD. A relationship between insulin resistance and endothelial dysfunction has been proposed as a link between cardiovascular and metabolic diseases (27). Endothelial dysfunction is defined as a reduced endothelium-dependent vasodilation (EDV) to vasodilators, such as acetylcholine (ACh) and bradykinin (BK), or flow-mediated vasodilation. Thus, EDV is generally used as a reproducible parameter to investigate endothelial function under various pathological conditions such as diabetes, obesity, and dyslipidemia. Whereas past studies were performed largely on males, there is increasing awareness by the National Institutes of Health (NIH) that research should include females. Here, we sought to study the effects of 2 mo supplementation with liquid fructose or glucose (20% wt/vol) on the metabolic response and vascular reactivity in aorta, a large conduit artery, in female rats. To measure the vascular function, EDV was assessed by examining the aortic relaxation responses to ACh and BK (receptor-mediated NO-dependent vasodilators). Aortic response to a NO donor was also determined by measuring the relaxation responses to sodium nitroprusside (SNP). Furthermore, vasoconstrictor responses to phenylephrine (PE) were studied. Our aims were to investigate the molecular mechanisms underlying the metabolic and vascular effects of these simple sugars and to determine whether these effects are exclusively related to increased calorie consumption.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals and experimental design.** Female Sprague-Dawley rats, aged 9–11 wk (Simonsen Laboratories, Gilroy, CA), were maintained with water and standard rodent chow food ad libitum at constant humidity and temperature, with a light-dark cycle of 12 h. After acclimation for 1 wk, the animals were randomly assigned to a control group, a glucose-supplemented group, and a fructose-supplemented group (14 rats/group). Sugars were supplied as a 20% (wt/vol) solution in drinking water for 8 wk. Body weight and food and drink intake were monitored throughout the experiment. After 8 wk, the rats were fasted for 12 h and euthanized using CO<sub>2</sub> according to the recommendations from the 2013 AVMA Guidelines on Euthanasia (28) and the NIH *Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals* (8th edition; U.S. NIH 2011). All animal protocols were approved by the Animal Care Committee of the University of the Pacific and complied with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8th edition; U.S. NIH 2011) and with ARRIVE guidelines. The 8-wk duration of sugar supplementation was chosen to mimic a subchronic regime, since this period of ingestion in rats is roughly equivalent to 6 yr of consumption in humans (45).

**Blood analysis.** Glucose, triglycerides, and cholesterol were measured in 12-h-fasted rats using an Accutrend Plus System glucometer and specific test strips (Roche Farma, Barcelona, Spain) with blood collected from the tail vein. Blood samples were obtained by intracardiac puncture and collected in tubes containing anticoagulant. Plasma was obtained by centrifugation at 10,000 g for 5 min at 4°C and stored at –80°C until used. Leptin (Invitrogen, Camarillo, CA), adiponectin (Adipogen, Liestal, Switzerland), and insulin (Spi Bio, Montigny Le Bretonneux, France) levels were determined in plasma samples by ELISA kits according to the manufacturer's protocol.

**Measurement of arterial tension.** The thoracic aortas were isolated and cleaned of fatty and adhering connective tissues and then cut into

2-mm rings, exactly. To measure isometric tension, the rings were suspended horizontally between two stainless steel hooks in individual organ baths containing 20 ml of Krebs buffer (in mM: 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.17 MgSO<sub>4</sub>, 24.9 NaHCO<sub>3</sub>, 0.023 EDTA, 1.6 CaCl<sub>2</sub>, and 6.0 glucose) at 37°C bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (40). Isometric tension was continuously monitored with a computer-based data acquisition system (PowerLab; ADInstruments, Colorado Springs, CO). The rings were equilibrated for 40 min under a resting tension of 1 g to allow development of a stable basal tone. Stimulation of rings with 80 mM KCl was repeated two times every 20 min until maximum contraction was achieved. The ability of ACh (10 μM) to induce relaxation of PE (2 μM)-precontracted vessels was taken as evidence for the preservation of the intact endothelium.

**Relaxation responses to ACh.** Aortic rings were contracted with PE (2 μM), a concentration that produced 80% of the maximal effect (EC<sub>80</sub>). Dilator-response curves were obtained by the addition of increasing concentrations of ACh (10<sup>–8</sup> to 10<sup>–5</sup> M).

**Relaxation responses to BK.** The concentration-response curves to BK were measured following the addition of increasing concentrations of BK (10<sup>–9</sup> to 10<sup>–5</sup> M) in U-46619 (100 nM)-precontracted aortic rings taken from all groups.

**Relaxation responses to SNP.** Responses to SNP (10<sup>–9</sup> to 10<sup>–5</sup> M), a NO-donor, were generated in the aortic rings precontracted with PE (2 μM) from all groups.

**Contractile responses to PE.** The constrictor concentration-response curves to PE (10<sup>–8</sup> to 10<sup>–5</sup> M) were generated before and after incubation with N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 200 μM), a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, in the presence of indomethacin (10 μM, dissolved in DMSO), a cyclooxygenase (COX) inhibitor. Between each concentration-response curve, tissues were washed with Krebs buffer to allow the rings to return to the basal tone. The use of this concentration of L-NAME was based on previous studies (18, 19). A vehicle-only (no drugs present) study was performed simultaneously in aortic rings from the same animal.

**Measurement of nitrate and nitrite in endothelial cells.** The permanently established EA.hy926 endothelial cell line (passage 5–6) (American Type Culture Collection, Manassas, VA) was plated and cultured in low-glucose (1,000 mg/l) Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Scientific) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin) at 37°C with 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Upon reaching 80% confluence, cells were treated with Recombinant Human gAcrp30/Adipolein (globular adiponectin, 5 and 15 μg/ml; Peprotech, Rocky Hill, NJ), high glucose or fructose (25 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The NO donor S-nitroso-N-acetyl-D, L-penicillamine (SNAP, 100 μM; Tocris Biosciences, Minneapolis, MN) was used as a positive control, and mannitol (25 mM; Sigma-Aldrich) was used as an osmotic control. After 30 min, cell culture supernatants were collected, and NO levels were determined by measurement of the end products of its metabolism (nitrate plus nitrite) using the Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) according to the manufacturer's suggestions. Five to six different samples for each condition were performed in duplicate.

**RNA isolation and real-time PCR.** Samples of liver, visceral white adipose, and aortic tissues were weighed, immediately frozen in dry ice, and stored at –80°C until used for RNA extraction. Total RNA was isolated from liver and adipose tissue samples by using TrizolR reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and from aortic samples using the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized by reverse transcription using the Omniscript reverse transcriptase kit (Qiagen). Samples were incubated at 37°C for 60 min in a MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA). The PCR reaction was carried out in the StepOnePlus Real-Time PCR System Thermal Cycling Block (Applied Biosystems, Foster City, CA) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 100 nM of each specific primer, and 10–50 ng of cDNA for each gene. PCR reactions

were performed in duplicate and normalized to a housekeeping gene using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. The TATA box-binding protein (*tbp*) was used as a control for liver, and  $\beta$ -actin (*actb*) was used for adipose tissue and aorta. Primer sequences and PCR product length are listed in Table 1.

**Preparation of total protein and nuclear extracts.** Aortic and visceral adipose tissue samples were micronized through freezing with liquid nitrogen and grinding with a mortar as previously described (7). Liver samples were homogenized with a Dounce homogenizer. For total protein extraction, lysis buffer with proteases, phosphatases, and acetylase inhibitors (in mM: 50 Tris-HCl, pH = 8, 150

NaCl, 10 NaF, 1 EDTA, 1 EGTA, 2 sodium pyrophosphate, 1 PMSF, 1  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 nicotinamide, 0.001 trichostatin A) plus 1% Igepal, 2  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, and 2  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin was used. Samples were incubated with this buffer for 1.5 h at  $4^\circ\text{C}$  and centrifuged at 15,000 g for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ , and supernatants were collected. To obtain hepatic nuclear extracts for the determination of the transcription factors peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), carbohydrate response element-binding protein (ChREBP), and sterol response element-binding protein-1c (SREBP-1C), homogenization buffer (in mM: 10 Tris-HCl, pH = 8, 1.5  $\text{MgCl}_2$ , 10 KCl, 2 sodium pyrophosphate, 10 NaF, 0.5 DTT, 1 PMSF, 1  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 nicotinamide, and

Table 1. Primers used for RT-PCR

Gene	GenBank No.	Primer Sequences	PCR Product, bp
<i>Ac6</i>	NM_001270785.1	Forward: 5'-FCTTTGGCCACCAGTTCTCTGC-3' Reverse: 5'-GCCTTGGCTAATTAAGCGCC-3'	107
<i>Ace</i>	NM_012544.1	Forward: 5'-GAGCCATCCTCCCTTTTTC-3' Reverse: 5'-GGCTGGAGTCTCTGGTATAG-3'	154
<i>Aco</i>	NM_017340.2	Forward: 5'-GTGAGGCGCCAGTCTGAAA-3' Reverse: 5'-ACTGCTGGGTTTGAATAATCCA-3'	70
<i>Actb</i>	NM_031144.3	Forward: 5'-CTAAGCCAAACCGTGAAAAG-3' Reverse: 5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAAA-3'	55
<i>Adipoq</i>	NM_144744.3	Forward: 5'-GAGACGCGAGGTCTCTTG-3' Reverse: 5'-CCTACGCTGAATGCTGAG-3'	148
<i>Adra1b</i>	NM_016991.2	Forward: 5'-AGCGGTAGATGTCCTGTGCT-3' Reverse: 5'-AGATGACCGTGGACAAGACC-3'	164
<i>Aldob</i>	NM_012496.2	Forward: 5'-ACAGCCTCCTACACCTACT-3' Reverse: 5'-GCTCATACTCGCACTTCA-3'	198
<i>Agtr1a</i>	NM_030985.4	Forward: 5'-CACAGTGTGCGGTTTCATT-3' Reverse: 5'-GTAAGGCCAGCCCTATGG-3'	63
<i>Agtr2</i>	NM_012494.3	Forward: 5'-TTGTGTTGGCATTTCATTTG-3' Reverse: 5'-ATACCCATCCAGGTGAGGAT-3'	76
<i>Bdkrb1</i>	NM_030851.1	Forward: 5'-CAGCGCTTAAGCATAGCGGAAAT-3' Reverse: 5'-CCAGTTGAAAACGGTCCCGATGTT-3'	112
<i>Bdkrb2</i>	NM_173100.2	Forward: 5'-TTTGTCTCAGCGTGTCTG-3' Reverse: 5'-TCACAAGCATCAGGAAGCAG-3'	226
<i>Cox1</i>	NM_017043.4	Forward: 5'-AAGTACTCATCGCCCTGGTACTC-3' Reverse: 5'-CATGTGCTGTGTGTAGGTTGGA-3'	75
<i>Cox2</i>	NM_017232.3	Forward: 5'-TCGACTTTTCCAGGATGGAAA-3' Reverse: 5'-GAGTGTCTTTGACTGTGGGAGGAT-3'	77
<i>eNos</i>	NM_021838.2	Forward: 5'-GTGACCCTCACCGATACACATAC-3' Reverse: 5'-GATGAGGTTGTCCGGGTGTCT-3'	73
<i>Fas</i>	NM_017332	Forward: 5'-GGCTCTATGGGTTGCCTAAGC-3' Reverse: 5'-GGTGGACCCAAAAAAGGA-3'	78
<i>Gcsa1</i>	NM_017090.2	Forward: 5'-CAGTGTGGAGAGCTGGATGCT-3' Reverse: 5'-AATCCCCCTGCCACACAAT-3'	68
<i>l-Cpt1a</i>	NM_031559.2	Forward: 5'-TGCAGAACACGGCAAAATGA-3' Reverse: 5'-CCGACCTGAGAGGACCTTGA-3'	70
<i>Leptin</i>	NM_013076.3	Forward: 5'-GGTCACCGGTTTGGACTTCA-3' Reverse: 5'-GGTCTGGTCCATCTTGGACAA-3'	67
<i>Nox1</i>	NM_053683.1	Forward: 5'-ATACACATCACCTTTTCATCATATCA-3' Reverse: 5'-GTTTGACCCCGGACAATCC-3'	76
<i>Nox4</i>	NM_053524.1	Forward: 5'-CGCACAGTCTGGCTTACCT-3' Reverse: 5'-GCTTTTGTCCAAACATCTTCTGTT-3'	75
<i>Pde4d</i>	NM_001113328.1	Forward: 5'-GCCAGCCTTCGAACTGTAAG-3' Reverse: 5'-ATGGATGGTTGGTTGCACAT-3'	98
<i>Pde5</i>	NM_133584.1	Forward: 5'-CCCTTTGGAGACAAAACGAGAG-3' Reverse: 5'-AGGACTTTGAGGAGAGAGC-3'	129
<i>Ptgis</i>	NM_031557.2	Forward: 5'-GCAGGAGAAAGGTCTGCTTGA-3' Reverse: 5'-TCCACTCCATACAGGTCAGGTA-3'	75
<i>Scd1</i>	NM_139192.2	Forward: 5'-CAGAGCCAGGTGCCACTTTT-3' Reverse: 5'-TGCTAGAGGTTGTACCAAGCTTT-3'	104
<i>Tbp</i>	NM_001004198.1	Forward: 5'-TGGGATTGTACCACAGTCCA-3' Reverse: 5'-CTCATGATGACTGCAGCAAAC-3'	132
<i>Tbxas</i>	NM_012687.1	Forward: 5'-GAGCTCCGAGAGCGGATATGG-3' Reverse: 5'-CTGGTCTGAAAATGACAATGTACAT-3'	76

*Ac*, Adenylyl cyclase; *Ace*, angiotensin I-converting enzyme; *Aco*, acyl-CoA oxidase; *Actb*, actin- $\beta$ ; *Adipoq*, adiponectin, C1Q and collagen domain containing; *Adra*, adrenergic receptor,  $\alpha$ ; *Agtr*, angiotensin II receptor; *Aldob*, aldolase B; *Bdkr*, bradikinin receptor; *Cox*, cyclooxygenase; *eNos*, endothelial nitric oxide synthase; *Fas*, fatty acid synthase; *Gcsa*, soluble guanylate cyclase; *l-Cpt*, liver carnitine palmitoyltransferase; *Nox*, NADPH oxidase; *Pde*, phosphodiesterase; *Ptgis*, prostaglandin  $\text{I}_2$  (prostacyclin) synthase; *Scd1*, stearoyl-CoA desaturase; *Tbp*, TATA box-binding protein; *Tbxas*, thromboxane synthase.

$10^{-6}$  trichostatin A) plus 2  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin and 2  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin was used. The homogenates were kept on ice for 10 min and centrifuged at 1,000  $g$  for 10 min at 4°C. Lysis buffer was added to the pellet obtained, and samples were incubated for 1.5 h at 4°C and centrifuged at 25,000  $g$  for 30 min at 4°C, and supernatants were collected. Protein concentrations were determined by the Bradford method (9).

**Western blot analysis.** Protein (20–30  $\mu\text{g}$ ) was subjected to SDS-PAGE. Proteins were then transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride transfer membranes (Millipore, Billerica, MA), blocked for 1 h at room temperature with 5% nonfat milk solution in 0.1% Tween 20-Tris-buffered saline, and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Primary antibodies for phosphorylated (p)-acetyl-CoA carboxylase (ACC) (Ser<sup>79</sup>), total ACC, p-V-akt murine thymoma viral oncogene homolog-2 (Akt) (Ser<sup>473</sup>), total Akt, p-endothelial NO synthase (eNOS) (Ser<sup>1177</sup>), inducible NO synthase (iNOS), cGMP-dependent protein kinase (PKG)-1 (recognizing both  $\alpha$ - and  $\beta$ -isoforms), p-vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) (Ser<sup>157</sup>), p-VASP (Ser<sup>239</sup>), and total VASP were supplied by Cell Signaling (Danvers, MA). Antibodies against insulin receptor substrate (IRS)-1, IRS-2, ChREBP, SREBP-1c, microsomal triglyceride transfer protein (MTP), and fatty acid synthase (FAS) were obtained from Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX). PPAR $\alpha$ , phosphodiesterase 4 (PDE4), and stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) antibodies were obtained from AbCam (Cambridge, UK). Antibody against rat liver CPT-1A was kindly provided by L. Herrero and D. Serra (Department of Biochemistry and Physiology, School of Pharmacy, University of Barcelona) (21, 37). Detection was performed using the Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) and Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, MI). To confirm the uniformity of protein loading, blots were incubated with  $\beta$ -actin or  $\beta$ -tubulin antibodies (Sigma-Aldrich) as a control.

**Data presentation and statistical analysis.** Results are expressed as the mean of  $n$  values  $\pm$  SE, where  $n$  represents data from one rat. Relaxation responses to ACh, BK, and SNP were calculated as the percentage of relaxation from maximum PE or U-46619 contraction. Similarly, the recorded increase in the force of contraction was calculated as the percentage of maximum contraction obtained with PE at the highest dose.  $EC_{50}$ , the concentration of the agonist that produces half of the maximum effect ( $E_{max}$ ), was calculated by a sigmoidal dose-response model (for variable slope) using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA). The sensitivity of the

agonists was expressed as  $pD_2$  values ( $-\log[EC_{50}]$ ). In general, statistical analyses were performed by one-way ANOVA test, after Gaussian distribution of the data was verified by the Kolmogorov-Smirnov normality test and equality of variance by Bartlett's test. When the ANOVA test returned  $P < 0.05$ , post hoc analysis using Bonferroni's test was performed. Comparison of concentration-response curves between groups was done using two-way ANOVA, with one factor being concentration and the other being groups. To compare the effect of L-NAME on the PE response, the PE results were expressed as differences of area under the concentration response curve ( $\Delta AUC$ ) in control (absence of L-NAME) and experimental (presence of L-NAME) conditions. The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

*Only fructose supplementation causes hypertriglyceridemia and increases body and liver weight.* As shown in Table 2, rats supplemented with 20% glucose or fructose increased their liquid consumption (by 2- and 1.5-fold, respectively). Furthermore, they partially compensated the increase in caloric intake by reducing the consumption of solid food (by 0.3-fold in the glucose group and by 0.5-fold in the fructose group). As a result, the total amount of ingested calories was increased in both groups. However, total caloric intake in glucose-supplemented rats was significantly higher than that of fructose-supplemented rats (1.15-fold). Despite this difference, only the fructose group exhibited a significant increase in final body weight (by 1.1-fold). Because of the increase in body weight, organ weights were normalized to femur length, which was not altered by sugar supplementation. Liver weight was increased only by fructose supplementation (by 1.4-fold vs. control and 1.3-fold vs. glucose-fed rats), whereas adipose tissue weight was significantly increased in both sugar-supplemented groups (by 5.6-fold in the glucose group and 5.2-fold in the fructose group). Consistent with the increase in adiposity, plasma leptin levels and adipose tissue leptin mRNA expression were also elevated in both experimental groups (Table 2).

Table 2. *Zoometric parameters, plasma/blood analytes, and adipokine mRNA levels in adipose tissue of female rats supplemented with 20% wt/vol liquid fructose or glucose for 2 mo*

	Control	Glucose	Fructose
AUC liquid intake, ml/rat for 2 mo	2,378 $\pm$ 127	4,778 $\pm$ 185*	3,577 $\pm$ 182**
AUC solid food intake, g/rat for 2 mo	874.8 $\pm$ 19.5	302.6 $\pm$ 24.4*	415.4 $\pm$ 21.1**
Amount ingested from solid, kcal/rat for 2 mo	2,642 $\pm$ 59	914 $\pm$ 74*	1,255 $\pm$ 634**
Amount ingested from liquid, kcal/rat for 2 mo	0	3,822 $\pm$ 148	2,862 $\pm$ 146
Total ingested kcal/rat for 2 mo	2,642 $\pm$ 59	4,736 $\pm$ 158*	4,116 $\pm$ 129**
Final body wt	239.1 $\pm$ 3.9	245.1 $\pm$ 5.5	254.9 $\pm$ 5.9*
Femur length, cm	3.32 $\pm$ 0.10	3.35 $\pm$ 0.05	3.38 $\pm$ 0.12
Adipose tissue wt/femur length, g/cm	0.37 $\pm$ 0.08	2.06 $\pm$ 0.29*	1.91 $\pm$ 0.38*
Liver wt/femur length, g/cm	2.92 $\pm$ 0.10	3.16 $\pm$ 0.19	4.00 $\pm$ 0.09**
Plasma leptin, ng/ml	2.46 $\pm$ 0.08	4.51 $\pm$ 0.09*	3.89 $\pm$ 0.08* #
Adipose tissue leptin mRNA levels, AU	100 $\pm$ 22	189 $\pm$ 28*	193 $\pm$ 26*
Plasma adiponectin, $\mu\text{g/ml}$	22.58 $\pm$ 2.4	58.42 $\pm$ 5.0*	26.48 $\pm$ 2.5
Adipose tissue AdipoQ mRNA levels, AU	100 $\pm$ 23	263 $\pm$ 48*	140 $\pm$ 32
Plasma insulin, mg/dl	0.67 $\pm$ 0.13	1.24 $\pm$ 0.24	1.64 $\pm$ 0.35*
Blood glucose, mg/dl	101.7 $\pm$ 5.1	112.7 $\pm$ 5.9	109.7 $\pm$ 6.0
Blood triglycerides, mg/dl	116.1 $\pm$ 3.9	125.7 $\pm$ 2.8	144.4 $\pm$ 13.1*
ISI	1.23 $\pm$ 0.02	0.88 $\pm$ 0.03*	0.76 $\pm$ 0.02*
Blood cholesterol, mg/dl	166.0 $\pm$ 1.4	166.6 $\pm$ 0.9	165.5 $\pm$ 0.8

Values are expressed as means  $\pm$  SE;  $n = 14$  rats/group for plasma/blood analytes and zoometric parameters;  $n = 8$  rats/group for mRNA expression. AUC, area under the curve; AU, arbitrary units; ISI, insulin sensitivity index, calculated as  $2/[\text{plasma insulin (nM)} \times \text{blood glucose } (\mu\text{M}) + 1]$ . \* $P < 0.05$  vs. control. # $P < 0.05$  vs. glucose-supplemented rats, one-way ANOVA test followed by Bonferroni's post hoc test.



Blood lipid analysis revealed that the cholesterol concentration was not modified in either glucose- or fructose-supplemented rats (Table 2). However, the levels of triglycerides were significantly increased in blood taken from fructose-supplemented rats (by 1.2-fold, Table 2).

Both sugars induce hepatic lipogenesis, but only fructose increases microsomal triglyceride transfer protein expression. The hypertriglyceridemia and increased liver weight observed in fructose-supplemented rats prompted us to examine the mRNA/protein expression of lipogenesis-related enzymes. The

mRNA expression of *scd1* was increased by glucose (3.4-fold) and fructose (4.2-fold) (Fig. 1A). Accordingly, SCD1 protein levels were increased after glucose and fructose supplementation (by 1.4- and 1.7-fold, respectively), but the increase in the glucose group did not reach statistical significance (Fig. 1B). Although the mRNA expression of *fas* showed a nonsignificant tendency to increase in both groups (Fig. 1C), FAS protein levels were significantly increased by 2-fold in glucose-supplemented and by 2.4-fold in the fructose-supplemented group (Fig. 1D). The amount of total and phosphorylated ACC was

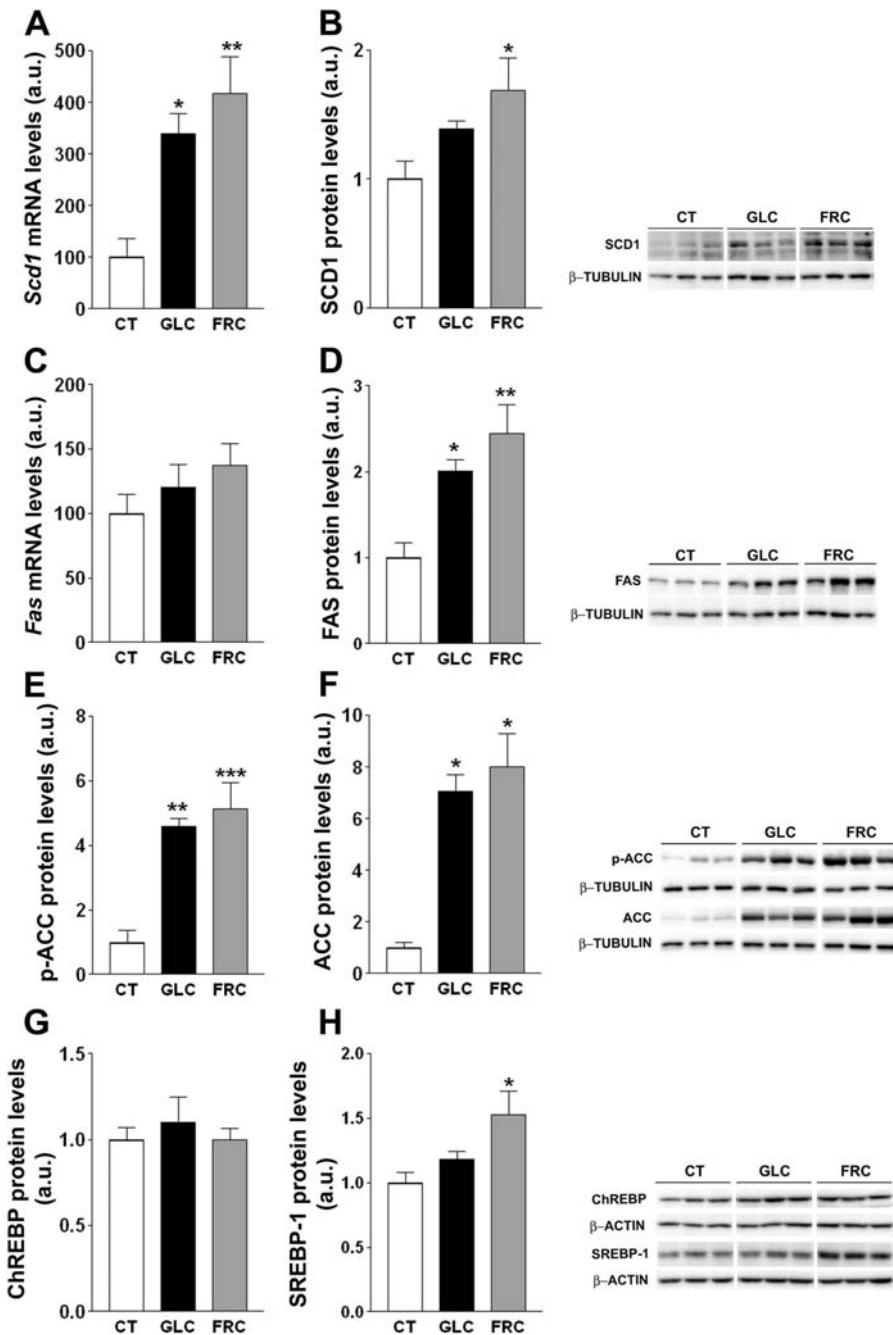


Fig. 1. Supplementation with glucose and fructose induces hepatic lipogenesis. mRNA levels of stearoyl-CoA desaturase-1 (*scd1*, A) and fatty acid synthase (*fas*, C) in the liver from control, glucose-, and fructose-supplemented rats. Bars represent means  $\pm$  SE of values obtained from  $n = 8$  animals. Protein levels of SCD1 (B), FAS (D), phosphorylated (p-) acetyl-CoA carboxylase (ACC, E), total ACC (F), carbohydrate response element-binding protein (ChREBP, G), and mature sterol response element-binding protein-1c (SREBP-1, H) in liver samples from control, glucose-, and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of values obtained from  $n = 5$  animals. To show representative bands corresponding to 3 different rats/treatment group, images from different parts of the same gel have been juxtaposed, which is indicated by white dividing lines in the figure. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  vs. control. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

significantly increased in the liver by both sugars (Fig. 1, *E* and *F*), suggesting that the degree of ACC activation was not modified. The expression of these lipogenic genes is mainly controlled by two transcription factors, SREBP-1c and ChREBP. Although the amount of ChREBP in nuclear extracts remained unaffected (Fig. 1*G*), the protein expression of the mature form of SREBP-1c was significantly increased only in hepatic nuclear extracts taken from fructose-supplemented rats (Fig. 1*H*).

As shown in Table 2, only glucose-supplemented animals displayed higher plasma adiponectin levels than controls (2.6-fold increase), which correlates with increased mRNA expression of the adiponectin gene in adipose tissue of this group (by 2.6-fold, Table 2). It has been shown that stimulation of adiponectin signaling activates PPAR $\alpha$ , a key factor in the transcriptional control of genes encoding fatty acid  $\beta$ -oxidation enzymes (29). Western blot analysis revealed that the expression of hepatic PPAR $\alpha$  was significantly increased only in the nuclear extracts from glucose-supplemented rats (by 1.3-fold) (Fig. 2*A*). Accordingly, the mRNA levels of PPAR $\alpha$  target genes, such as liver carnitine palmitoyl-CoA transferase-I (*I-cpt-1a*) and acyl-CoA oxidase (*aco*), were significantly increased only in the liver of glucose-supplemented animals (Fig. 2, *B* and *C*). When we determined L-CPT-1A protein levels, we found no significant difference between the glucose-supplemented and the control group. However, the protein level of L-CPT-1A was significantly reduced in liver samples taken from fructose-supplemented rats (by 0.5-fold, Fig. 2*D*). Because the amount of plasma triglycerides not only depends on the balance between the synthesis and catabolism of fatty acids in the liver, but also on the export of triglycerides from hepatocytes, we also determined the protein expression of MTP. This protein is essential for the assembly and secretion of very-low density lipoproteins (VLDL) by the liver. As shown in Fig. 2*E*, MTP protein expression was increased only in fructose-supplemented rats.

*Supplementation with fructose and glucose impairs insulin signaling in aorta and liver.* Plasma glucose concentrations were not altered after simple sugar supplementation (Table 2). On the other hand, fructose increased plasma insulin concentration (by 2.4-fold), and the glucose-supplemented group showed a tendency ( $P = 0.07$ ) to higher plasma insulin level. Thus, the insulin sensitivity index (ISI) was significantly reduced in both glucose- and fructose-supplemented rats (Table 2), suggesting that insulin signaling could be impaired in these groups. Therefore, we analyzed the expression of IRS-1 and IRS-2, the main insulin signal transducers in the liver and in aortic tissue. Our results show that the protein expression of hepatic IRS-1 was not altered by sugar supplementation (Fig. 3*A*), but IRS-2 expression was significantly reduced in both groups (by 0.5-fold in glucose-supplemented and by 0.4-fold in fructose-supplemented animals, Fig. 3*B*). On the other hand, both IRS-1 and IRS-2 protein levels were reduced in aortic tissue from fructose- and glucose-supplemented rats (Fig. 3, *C* and *D*). We also determined the expression of Akt, one of the main transducers of insulin signaling downstream of IRS in both tissues. The amount of p-Akt was significantly reduced only in the livers of fructose-supplemented rats compared with the control group, whereas total Akt protein remained unaffected by both sugars (Fig. 3*E*). Similarly, in aortic tissues, the expression of p-Akt was significantly reduced only in fructose-

fed animals, and total Akt expression was not significantly modified by sugar supplementation (Fig. 3*F*).

*Supplementation with glucose and fructose alters relaxation responses of aortic rings to a NO donor.* Relaxation to ACh was used to examine the effect of simple sugars on the receptor-mediated endothelium-dependent release of NO. No significant differences in responses to ACh ( $10^{-8}$  to  $10^{-5}$  M) occurred between aortic rings from the control, glucose-, and fructose-supplemented groups (Fig. 4*A*). Both the sensitivity of aortic rings to ACh as assessed by  $-\log[EC_{50}]$  (pD $_2$ ) and the  $E_{max}$  to ACh were similar in all groups (Fig. 4*A* and Table 3). Similar to the findings for ACh, the sensitivity and  $E_{max}$  to BK, another receptor-mediated endothelium-dependent vasodilator agent, were not affected by sugar supplementation (Fig. 4*B* and Table 3). However, there was a significant rightward shift of the BK response curve in aortic rings from fructose-supplemented rats relative to control animals (Fig. 4*B*).

Aortic relaxation responses to a NO donor were also investigated by performing concentration-response curves to SNP ( $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  M). Although the  $E_{max}$  to SNP was similar in all groups (Table 3), supplementation with glucose significantly augmented the responsiveness of aortic rings to SNP. On the other hand, fructose supplementation significantly attenuated the sensitivity of aortic rings to SNP (Fig. 4*C* and Table 3).

*Glucose (but not fructose) supplementation reduces the contractile response of aortic rings.* Eight weeks of fructose supplementation did not affect vasoconstrictor responses of rat aorta to PE, as shown in Fig. 5*A* and Table 3. However, PE-induced maximal contractions were reduced significantly in aortic rings from glucose-supplemented rats compared with controls (Fig. 5*A* and Table 3). Despite that PE contractile responses were affected by glucose supplementation, the mRNA expression of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors was unchanged (Table 4). To study the possible role of basal NO, PE-response curves were performed in aortic rings before and after pretreatment with the NO synthase inhibitor L-NAME (200  $\mu$ M, 20 min) in the presence of indomethacin (10  $\mu$ M). The difference in the contractile level to PE after addition of L-NAME would indicate the extent of endothelial NO release (13, 20). Incubation of the aortic rings with L-NAME resulted in a significant increase of the contractile responses to PE in all groups (Fig. 5, *C-E*). However, the  $\Delta$ AUC, defined as difference in the area under the curve between the PE-concentration response curve before and after L-NAME, were only higher in aortas of the rats supplemented with glucose compared with the control group (Table 5).

To investigate a mechanism by which NO release might have been increased in glucose-supplemented rats, eNOS activation by phosphorylation was investigated. As shown in Fig. 6*A*, the phosphorylation of eNOS at Ser<sup>1177</sup> was increased in aortic tissue from glucose- but not fructose-supplemented rats, whereas the expression of total eNOS showed no significant difference between the simple sugar-supplemented groups and the control group.

On the other hand, protein levels of iNOS in aorta were increased significantly only in the fructose-supplemented animals (by 1.8-fold) (Fig. 6*B*).

*In vitro adiponectin (but not glucose or fructose) treatment increases the NO level in EA.hy926.* It is well known that adiponectin stimulates the synthesis of NO in endothelial cells. Thus, the increase in adiponectin levels observed in glucose-

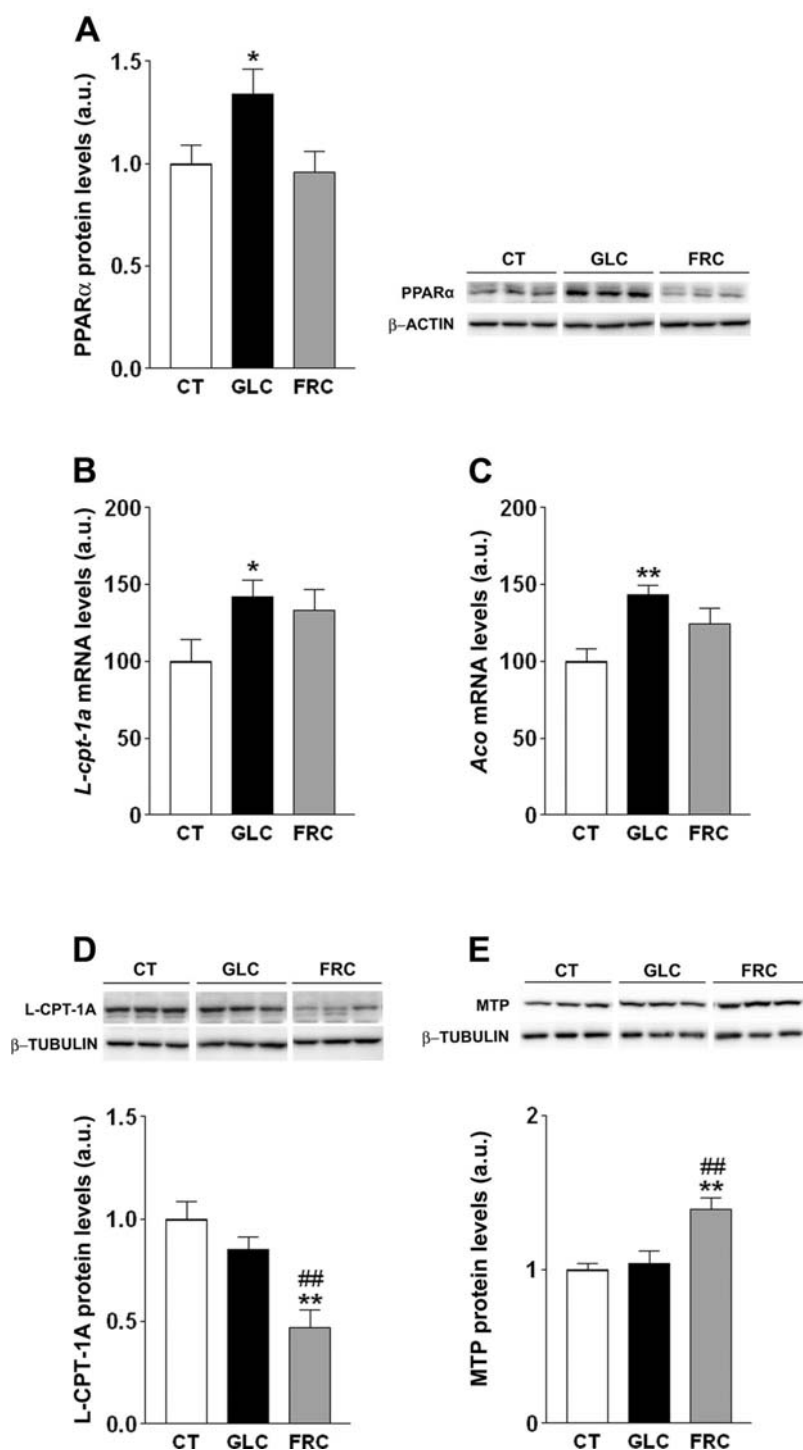


Fig. 2. Differential effects of glucose and fructose on peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), PPAR $\alpha$  target genes, and microsomal triglyceride transfer protein (MTP). Protein levels of PPAR $\alpha$  (A), liver carnitine palmitoyl-CoA transferase-I (L-CPT-1A, D), and MTP (E) in hepatic samples from control, glucose-, and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of values obtained from  $n = 5$  animals. To show representative bands corresponding to 3 different rats/treatment group, images from different parts of the same gel have been juxtaposed, which is indicated by white dividing lines. mRNA levels of *l-cpt-1a* (B) and acyl-CoA oxidase (*aco*, C) in hepatic samples from control, glucose-, and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of values obtained from  $n = 8$  animals. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. control; ## $P < 0.01$  vs. glucose. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

supplemented rats could be responsible for the elevated basal NO in this group. To test this hypothesis, we determined the effects of adiponectin or high glucose or fructose on NO level in endothelial EA.hy926 cells. As shown in Fig. 7, incubation of EA.hy926 cells with 25 mM glucose or fructose for 30 min did not alter cellular NO production, whereas incubation with

5 and 15  $\mu\text{g/ml}$  adiponectin dose dependently (and significantly for the highest concentration) increased NO levels in the cell culture supernatant.

*Differential effects of fructose and glucose supplementation on intracellular pathways related to aortic relaxation.* To study the molecular mechanisms that could explain the differences in

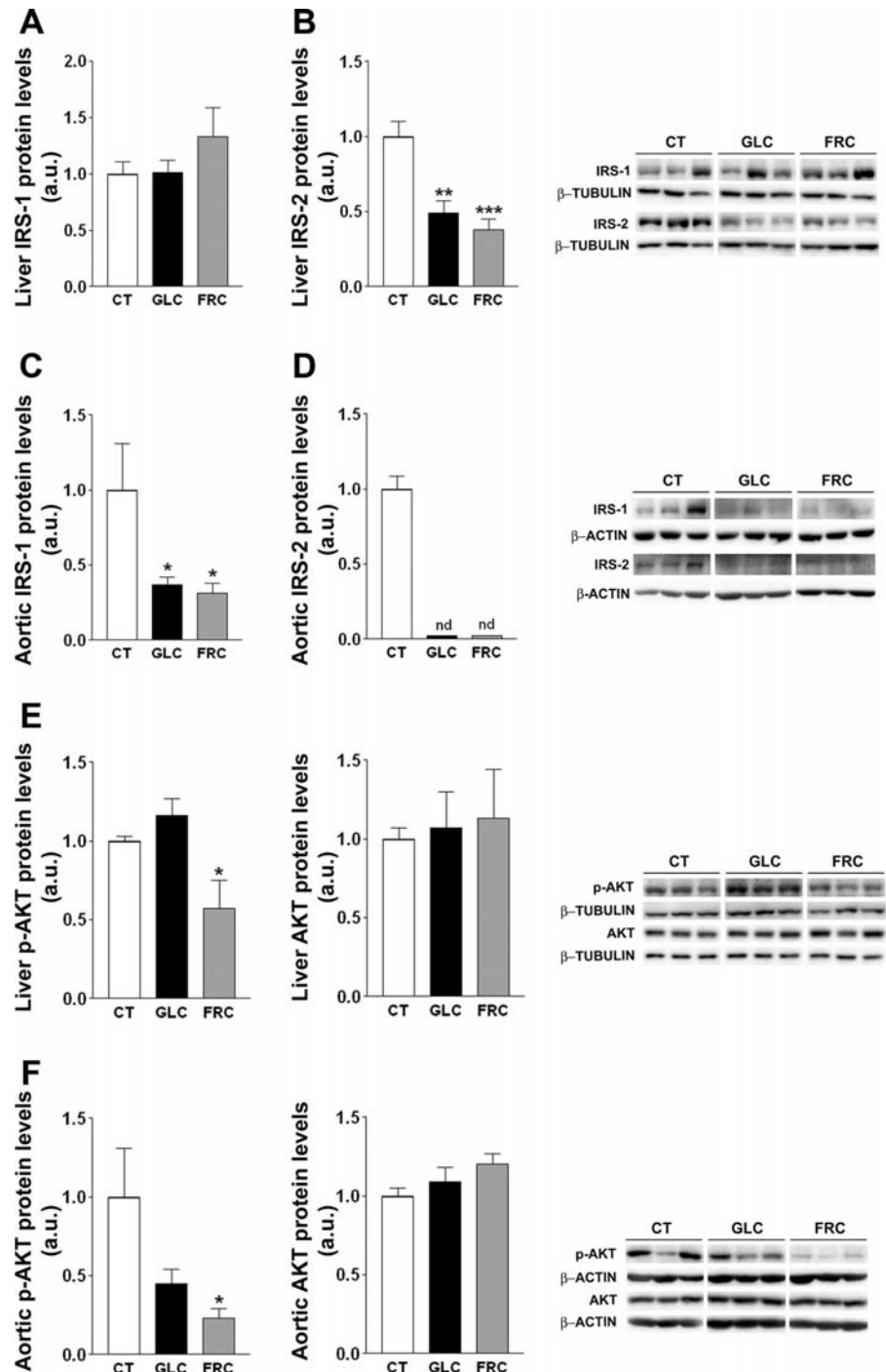


Fig. 3. Effects of glucose and fructose supplementation on the expression of proteins involved in insulin signaling in liver and aortic tissues. Protein levels of hepatic insulin receptor substrate (IRS)-1 (A) and IRS-2 (B), aortic IRS-1 (C) and IRS-2 (D), and hepatic (E) and aortic (F) phosphorylated and total V-akt murine thymoma viral oncogene homolog-2 (Akt) in samples from control, glucose-, and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of values obtained from  $n = 5$  animals. To show representative bands corresponding to 3 different rats/treatment group, images from different parts of the same gel have been juxtaposed, which is indicated by white dividing lines. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  vs. control. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

the responses of aortic rings from rats supplemented with glucose or fructose, the expression of several molecular mediators of vascular relaxation were examined. The NO-dependent relaxation is mediated by cGMP signaling, which leads to the stimulation of a specific PKG, resulting in the phosphorylation of VASP in Ser<sup>239</sup> (44). Our results show that the mRNA expression of soluble guanylate cyclase (*gsal*) in aortas from fructose-

supplemented rats was reduced by 0.8-fold compared with controls (Fig. 8A). Neither the mRNA levels of the phosphodiesterase that hydrolyses cGMP (*pde5*) (Fig. 8A) nor the protein expression of PKG (Fig. 8B) was significantly modified by sugar supplementation. However, phosphorylation of VASP in Ser<sup>239</sup> was reduced in both sugar-supplemented groups vs. control (Fig. 8C), and the amount of total VASP also showed

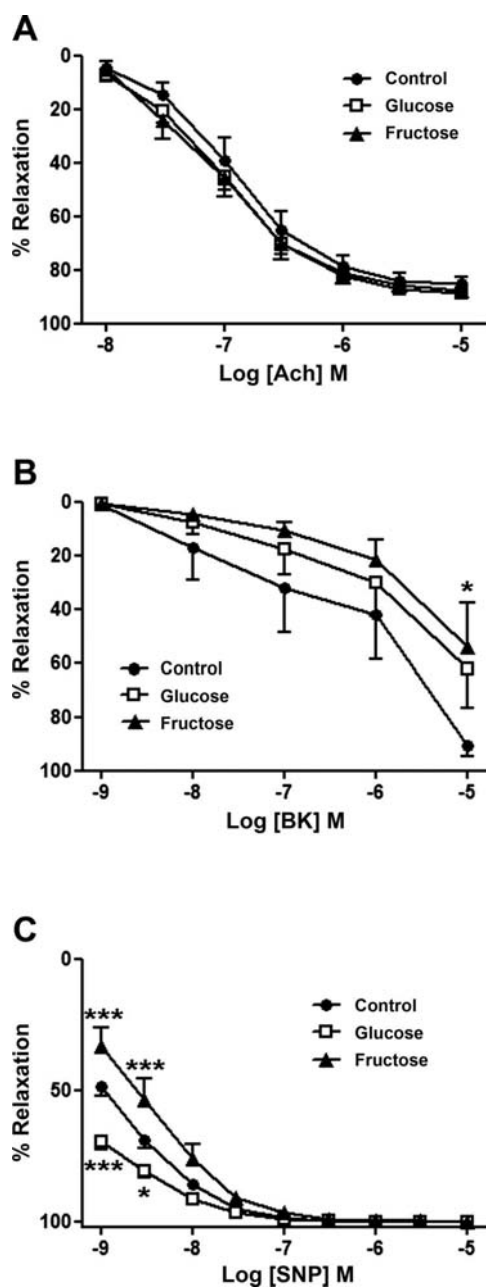


Fig. 4. Effects of supplementation with glucose and fructose on the responses of aortic rings to relaxation agents. Relaxation responses to cumulative concentrations of acetylcholine (ACh, A), bradykinin (BK, B), and sodium nitroprusside (SNP, C) in intact aortic rings from female rats after 2 mo of supplementation with 20% wt/vol liquid fructose or glucose. Aortic rings were precontracted with phenylephrine (2  $\mu$ M) (A and B) or U-46619 (100 nM) (C). Data are expressed as means  $\pm$  SE of values obtained from  $n = 5$ –8 animals. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. control, analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

a reduction, which was significant only in fructose-supplemented rats (Fig. 8D).

The NO-independent vasodilatory pathway in large conduit arteries is mainly controlled by cAMP levels resulting in the phosphorylation of VASP in Ser<sup>157</sup> (44). Aortic tissue

adenylyl cyclase (AC6) mRNA levels and phosphorylation of protein kinase A (PKAc) in Thr<sup>197</sup> were not significantly modified by sugar supplementation compared with control rats, although fructose-supplemented rats showed reduced values compared with the glucose group (Fig. 8, A and F). Fructose supplementation significantly increased the mRNA and protein expression (by 1.9- and 1.5-fold, respectively) of PDE4, which specifically catalyzes the hydrolysis of cAMP (Fig. 8, A and G). Thus, the combined reduction of total VASP and the putative decrease of cAMP levels may explain the significant reduction of VASP Ser<sup>157</sup> phosphorylation (by 1.46-fold) that was observed only in fructose-supplemented rats (Fig. 8E).

Finally, to rapidly identify possible changes in other pathways involved in the vascular effects of simple sugars, we measured the mRNA level of a broad range of genes associated with vascular function. As shown in Table 4, the mRNA expression of genes and enzymes such as angiotensin II and BK receptors, cyclooxygenases, prostacyclin synthase, or thromboxane synthase, which have been reported to be involved in aortic reactivity, remained unaffected by sugar supplementation. Although we are aware that mRNA expression and protein abundance are not always well correlated, the lack of effect of sugar supplementation on the mRNAs analyzed discouraged us from further studying the involvement of these pathways on the observed vascular effects.

#### DISCUSSION

The adverse effects of simple sugar consumption on metabolic function are well documented in human and animal studies (3, 49, 51), and there are also reports on the effects of diets supplemented with fructose or high-fructose corn syrup on vascular reactivity in rodents (2, 5, 16, 31, 38). Most of

Table 3.  $pD_2$  and  $E_{max}$  or  $tension_{max}$  to vasodilator and vasoconstrictor agents in aortas from female rats supplemented with 20% wt/vol liquid fructose or glucose for 2 mo

	$n$	$pD_2$	$E_{max}$ , %
<b>ACh</b>			
Control	8	6.75 $\pm$ 0.15	85.21 $\pm$ 2.63
Glucose	8	6.86 $\pm$ 0.10	85.59 $\pm$ 2.12
Fructose	8	6.88 $\pm$ 0.15	87.59 $\pm$ 2.46
<b>BK</b>			
Control	5	6.27 $\pm$ 0.51	90.51 $\pm$ 4.26
Glucose	6	5.00 $\pm$ 0.80	62.48 $\pm$ 14.22
Fructose	5	4.58 $\pm$ 0.69	54.38 $\pm$ 16.60
<b>SNP</b>			
Control	8	8.97 $\pm$ 0.07	100.23 $\pm$ 0.28
Glucose	8	9.51 $\pm$ 0.10*	100.01 $\pm$ 0.19
Fructose	8	8.64 $\pm$ 0.14	100.01 $\pm$ 0.19
<b>PE</b>			
Control	7	7.15 $\pm$ 0.08	1.60 $\pm$ 0.15
Glucose	8	7.02 $\pm$ 0.08	1.10 $\pm$ 0.10*
Fructose	7	7.32 $\pm$ 0.10	1.54 $\pm$ 0.14

Data are expressed as means  $\pm$  SE;  $n$ , no. of rats/group.  $E_{max}$ , maximum effect;  $tension_{max}$ , maximum tension; ACh, acetylcholine; BK, bradykinin; SNP, sodium nitroprusside; PE, phenylephrine. \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA test followed by Bonferroni's post hoc test.

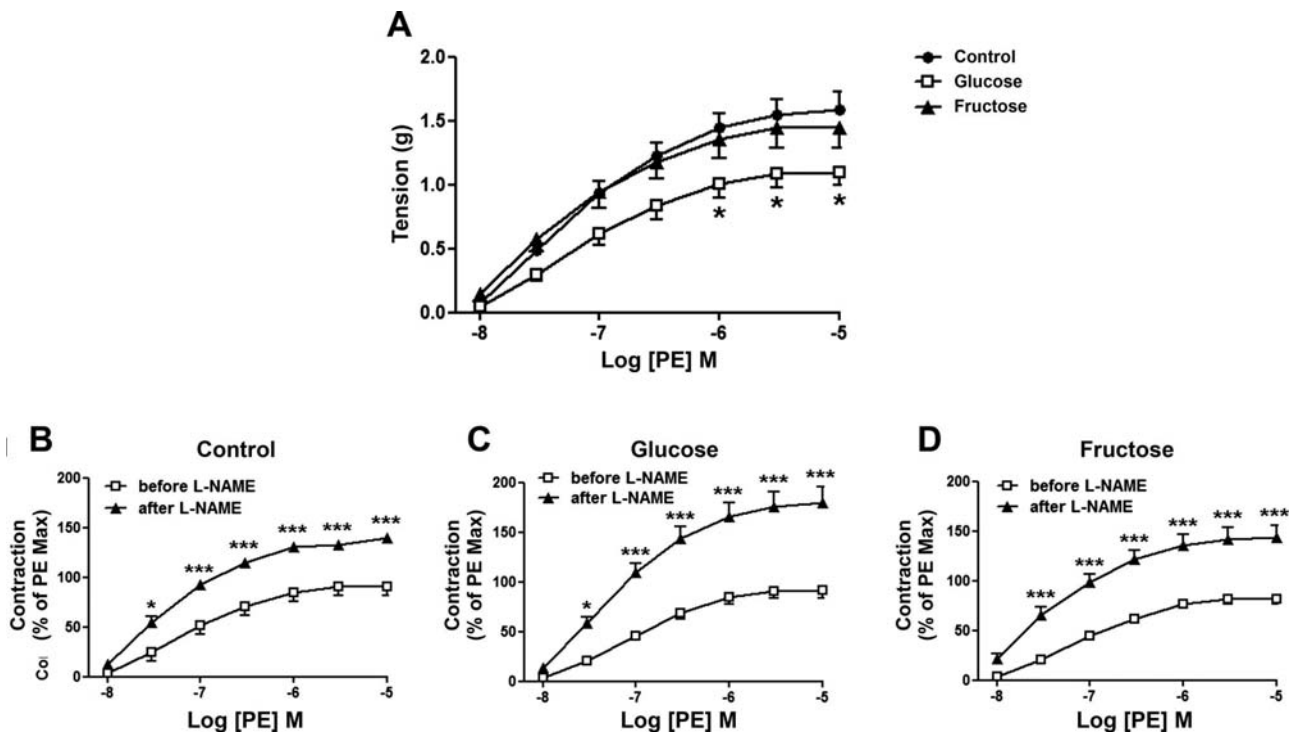


Fig. 5. Supplementation with glucose reduces the contractile responses of aortic rings. *A*: contractile responses to cumulative concentrations of phenylephrine (PE) in intact aortic rings from female rats after 2 mo of supplementation with 20% wt/vol liquid fructose or glucose. *B–D*: contraction to PE was measured in aortae from control, glucose-, and fructose-supplemented rats before and after incubation with *N*<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 200  $\mu$ M). Responses were performed in the presence of indomethacin (10  $\mu$ M). Data are expressed as means  $\pm$  SE of values obtained from  $n = 7–8$  animals. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. control condition (control rats in *A*, before L-NAME in *B–D*), analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

these studies were performed on males, but there is increasing awareness to include females in research studies. To our knowledge we are the first to compare the effects of simple sugar (glucose or fructose) consumption on female rat metabolic factors and aortic function. Here, we identify some key molecular targets responsible for metabolic and vascular disturbances induced by simple sugar supplementation in liquid form to female rats. We also provide evidence that these effects

are not merely a direct result of the amount of ingested calories.

We previously reported that the ingestion of liquid fructose elicits an incomplete compensatory reduction of solid food consumption in rats, leading to an increase in total caloric intake (7, 41–43, 54, 55). Our current data show that, when rats are supplemented with a glucose solution, the compensatory response is even worse compared with fructose supplementation, since liquid intake is higher and comparatively solid food consumption is reduced to a lesser extent. As a result, the total caloric intake is higher in rats receiving glucose than in rats with fructose supplementation (Table 2). It has been suggested that, if simple sugars cause any adverse effects on health, these effects are exclusively because of the calories that the sugars provide (26). According to this hypothesis, the metabolic and vascular alterations in the present study should have been equal or more intense in glucose-supplemented rats. On the contrary, our results show that, compared with the fructose group, rats supplemented with liquid glucose exhibit less adverse metabolic and vascular effects. Analysis of the results shown in Table 2 and Fig. 3 indicates that both sugars impair insulin signaling in the liver and aortic tissue, but the effect is far more intense in fructose- than in glucose-supplemented rats. Although hepatic and aortic IRS-1/2 were reduced to a similar extent by glucose and fructose, p-Akt was significantly decreased in the liver and aorta of fructose-supplemented animals only. This is in accordance with our previous results showing an abnormal glucose tolerance test and reduced p-Akt in

Table 4. mRNA expression of genes related to vascular reactivity in aortic tissue from female rats supplemented or not with 20% wt/vol liquid fructose or glucose for 2 mo

	Control	Glucose	Fructose
<i>Cox-1</i>	100 $\pm$ 14	132 $\pm$ 6	115 $\pm$ 11
<i>Cox-2</i>	100 $\pm$ 7	121 $\pm$ 29	77 $\pm$ 18
<i>Ptgis</i>	100 $\pm$ 9	95 $\pm$ 5	89 $\pm$ 5
<i>Tbxas</i>	100 $\pm$ 17	85 $\pm$ 10	92 $\pm$ 6
<i>Ace</i>	100 $\pm$ 12	87 $\pm$ 7	78 $\pm$ 7
<i>Agtr1a</i>	100 $\pm$ 25	100 $\pm$ 6	91 $\pm$ 12
<i>Agtr2</i>	100 $\pm$ 34	94 $\pm$ 22	85 $\pm$ 25
<i>Aldob</i>	104 $\pm$ 25	149 $\pm$ 51	140 $\pm$ 39
<i>Adra1a</i>	100 $\pm$ 40	194 $\pm$ 65	102 $\pm$ 14
<i>Adra1b</i>	100 $\pm$ 8	129 $\pm$ 22	144 $\pm$ 18
<i>Adra1d</i>	100 $\pm$ 8	114 $\pm$ 22	113 $\pm$ 18
<i>Bdkrb1</i>	100 $\pm$ 39	93 $\pm$ 28	102 $\pm$ 45
<i>Bdkrb2</i>	100 $\pm$ 19	142 $\pm$ 33	118 $\pm$ 25
<i>Nox1</i>	100 $\pm$ 38	123 $\pm$ 36	102 $\pm$ 36
<i>Nox4</i>	100 $\pm$ 3	130 $\pm$ 9	124 $\pm$ 7

Data are expressed as means  $\pm$  SE.

Table 5.  $E_{max}$ ,  $tension_{max}$ ,  $pD_2$ , and  $\Delta AUC$  to phenylephrine in aortas from female rats supplemented with 20% wt/vol liquid fructose or glucose for 2 mo

	<i>n</i>	$E_{max}$ , %	$Tension_{max}$ , g	$pD_2$	$\Delta AUC$
Control	7				
Before L-NAME		91.10 ± 9.19	1.48 ± 0.24	7.05 ± 0.09	
After L-NAME		139.7 ± 4.00**	2.21 ± 0.18*	7.30 ± 0.07	116.90 ± 21.49
Glucose	8				
Before L-NAME		92.05 ± 8.15	0.97 ± 0.07	6.98 ± 0.06	
After L-NAME		179.4 ± 16.07*#	1.86 ± 0.08**	7.20 ± 0.06	197.24 ± 30.78#
Fructose	7				
Before L-NAME		81.63 ± 5.32	1.26 ± 0.16	7.05 ± 0.05	
After L-NAME		143.6 ± 11.62*	2.16 ± 0.17*	7.38 ± 0.08	158.90 ± 19.75

Data are expressed as means ± SE; *n*, no. of rats/group. L-NAME, *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester. \**P* < 0.05 vs. before L-NAME, paired Student's *t*-test. \*\**P* < 0.01 vs. before L-NAME, paired Student's *t*-test. #*P* < 0.05 vs. control, one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

female rats supplemented with 10% liquid fructose, but not glucose, for 2 mo (6). In the current study, insulin resistance is observed not only in the liver but also in aortic tissues of fructose-supplemented animals, suggesting a common origin for both metabolic and vascular dysfunction.

Moreover, our data show that the hypertriglyceridemia appears only in fructose-supplemented rats. This observation cannot be explained solely by increased hepatic lipogenesis, since both sugars induced the expression of major lipogenic genes. However, fructose supplementation induced a more prominent effect (Fig. 1). Hepatic lipogenesis is controlled by two transcription factors, SREBP-1c and ChREBP (57). Because ChREBP is activated by phosphorylated intermediates derived from the direct metabolism of dietary carbohydrates (1), the 12-h fasting period in our study explains the lack of activation of this transcription factor (Fig. 1G). On the contrary, activation of SREBP-1c by carbohydrates is not a direct

effect but it is mediated by an increase in plasma insulin levels (57), a mechanism that is maintained in insulin resistance states (24). In the present study, plasma insulin level was markedly elevated only in fructose-supplemented animals (Table 2), driving the increased expression of SREBP-1c in hepatic nuclear extracts from this group (Fig. 1H).

Regarding lipid catabolism, fructose supplementation did not affect hepatic PPAR $\alpha$  nuclear content or the mRNA expression of *l-cpt-1a*, a PPAR $\alpha$  target gene. However, when we determined the protein expression of L-CPT-1A, we observed a significant decrease in the liver of the fructose-supplemented rats (Fig. 2D). L-CPT-1A catalyzes the rate-limiting step of the hepatic mitochondrial  $\beta$ -oxidation of fatty acids, suggesting that this process may be inhibited in the liver by fructose supplementation. On the contrary, fructose increased the hepatic expression of MTP, a protein that is essential for the assembly of triglycerides into VLDL and for the secretion of

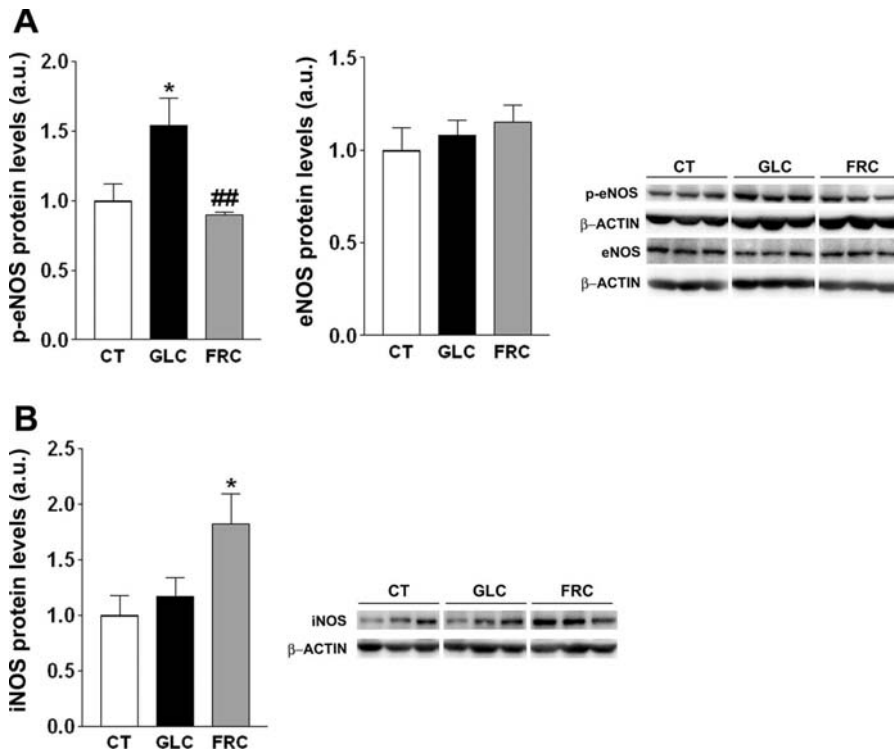


Fig. 6. Supplementation with glucose enhances endothelial NO synthase (eNOS) phosphorylation, and supplementation with fructose increases inducible NO synthase (iNOS) expression in aortic tissue. Western blots of phosphorylated and total eNOS (A) and iNOS (B) in aortic samples from control, glucose-, and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean ± SE of values obtained from *n* = 5 animals. To show representative bands corresponding to 3 different rats/treatment group, images from different parts of the same gel have been juxtaposed, which is indicated by white dividing lines. \**P* < 0.05 vs. control; ##*P* < 0.01 vs. glucose. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

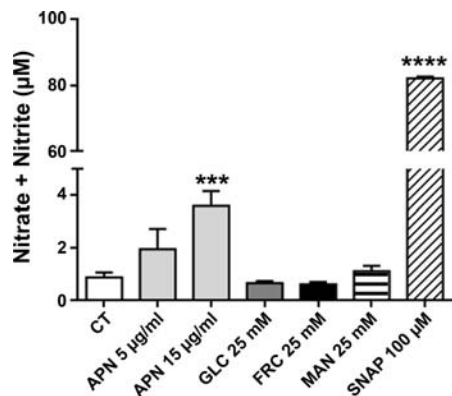


Fig. 7. In vitro adiponectin (but not glucose or fructose) increases NO level in EA.hy926 cells. Levels of nitrate and nitrite in EA.hy926 medium after incubation with vehicle (CT), adiponectin (APN, 5 and 15 µg/ml), 25 mM glucose, 25 mM fructose, 25 mM mannitol (MAN), and the NO donor *S*-nitroso-*N*-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP, 100 µM). Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 5–6 different assays performed in duplicate. \*\*\*\* $P$  < 0.001 and \*\*\*\* $P$  < 0.0001 vs. control. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

these lipoproteins (17). This effect had been already reported in fructose-fed hamsters, and was correlated to hepatic insulin resistance (11, 50). Taking these results together, the hypertriglyceridemia observed in the fructose-supplemented rats may arise from the combined effects of increased lipogenesis, reduced fatty acid catabolism, and enhanced triglyceride export from liver to plasma in the form of VLDL through MTP induction.

On the other hand, plasma adiponectin level is increased in glucose-supplemented rats, which correlates with increased mRNA expression of adiponectin in adipose tissue of this group (Table 2). Although the mechanism responsible for this inductive effect is unclear, our results suggest that the overexpression of hepatic PPAR $\alpha$  in this group may be because of the elevated level of adiponectin. This theory is supported by other reports showing that adiponectin upregulates PPAR $\alpha$  expression (58). It should be noted that, despite PPAR $\alpha$  induction and elevated *l-cpt-1a* mRNA in the glucose-supplemented group, we did not observe increased hepatic CPT-1A protein expression, suggesting that fatty acid oxidation is not induced by glucose supplementation. Overall, our results on the decreased L-CPT-1A protein levels in fructose-supplemented rats suggest that simple sugars might affect L-CPT-1A protein stability, causing a reduction in its hepatic content. However, this effect is counteracted in glucose-supplemented rats, possibly via the control of its expression by increased PPAR $\alpha$ .

It has been shown that adiponectin stimulates NO production in vascular endothelial cells (12), and therefore the enhanced basal NO in aortae of glucose-supplemented rats (Table 5) may result from an increased adiponectin in this group. In the current study, we assessed the in vitro effects of adiponectin, high glucose, or fructose on NO level by measuring NO metabolites. Treatment of EA.hy926 with adiponectin but not high glucose or fructose caused a significant increase in NO level in these cells (Fig. 7). These results exclude a direct effect of glucose on NO production and suggest that elevated adiponectin is the possible cause of increased NO in aortae of glucose-supplemented rats. Moreover, it has been reported that

adiponectin stimulates the synthesis of NO in endothelial cells by phosphorylation of eNOS at Ser<sup>1177</sup> (12, 15), and our results show that eNOS phosphorylation at this position is increased in aortic tissues from glucose-supplemented rats (Fig. 6A). Taken together, these results suggest that the increase in basal NO after glucose supplementation could be mainly attributed to the hyperadiponectinemia observed in this group.

Elevated basal NO in aortae from glucose-supplemented rats may also, in part, explain decreased vasoconstrictor response to PE in this group (Fig. 5B). In addition, the fact that the SNP-induced relaxation was increased in the glucose-supplemented group suggests that the increased sensitivity of intact aorta to NO may also contribute to the decreased PE contractile responsiveness. It is important to note that glucose supplementation enhanced aortic responses to SNP despite a decrease in phosphorylation of VASP at Ser<sup>239</sup> and preserved PKG expression, suggesting that VASP phosphorylation or upstream cGMP-dependent phosphorylation of VASP is not a mechanism for the increased relaxation response to SNP. Along similar lines, Aszódi et al. observed an intact relaxation after exposure to cGMP and cAMP in aortic rings of VASP null mice (4). Furthermore, Yousif et al. (60) reported that SNP induces cGMP-independent vasodilator responses in the perfused rabbit ovarian vascular bed. Unlike the glucose-supplemented group, our data show that SNP-induced relaxation is significantly reduced in aortic rings of the fructose-supplemented rats. Assessments of vasodilatory responses in the presence of a soluble guanylate cyclase inhibitor or a PKG inhibitor/activator could help to determine how fructose and glucose differentially influence the NO/cGMP/PKG relaxation pathways.

EDV is used as a reproducible parameter to investigate endothelial function under various pathological conditions. In the present study, we showed a preserved EDV of the aorta in the sugar-supplemented rats despite the altered relaxation responses to SNP. Accordingly, Mourmoura et al. (33) reported that the EDV of coronary arteries was fully maintained while the response to a NO donor was even enhanced in type 2 diabetic rats. Both impairment (16, 31, 38) or no change (23, 36) of EDV in vessels from fructose-supplemented rats have been reported. The varied vasodilatory responses after sugar supplementation may be attributed to differences in the type of the agents used, animal's sex and strain, vascular beds, and duration of sugar supplementation.

NO has been generally considered as the principal mediator of EDV in normal state in large arteries, and impaired EDV is often associated with reduced bioavailability of NO. However prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) may also be important regulators of vascular tone and reactivity in diabetes. There is an established negative regulatory effect of NO on EDHF synthesis (8). On the other hand, an augmented EDHF response was shown to compensate for the loss of NO-mediated vasorelaxation in arteries in diabetic rats (46). In agreement with those studies that demonstrate compensatory interactions between pathways, the preserved ACh response (regardless of altered SNP responses) suggests that other molecules besides NO (e.g., EDHF or PGI<sub>2</sub>) may be involved in ACh relaxation. The fact that AC6 mRNA and phosphorylated PKA protein levels were significantly reduced in aorta taken from fructose rats (Fig. 8. A and F) suggests that the preserved ACh responses in the



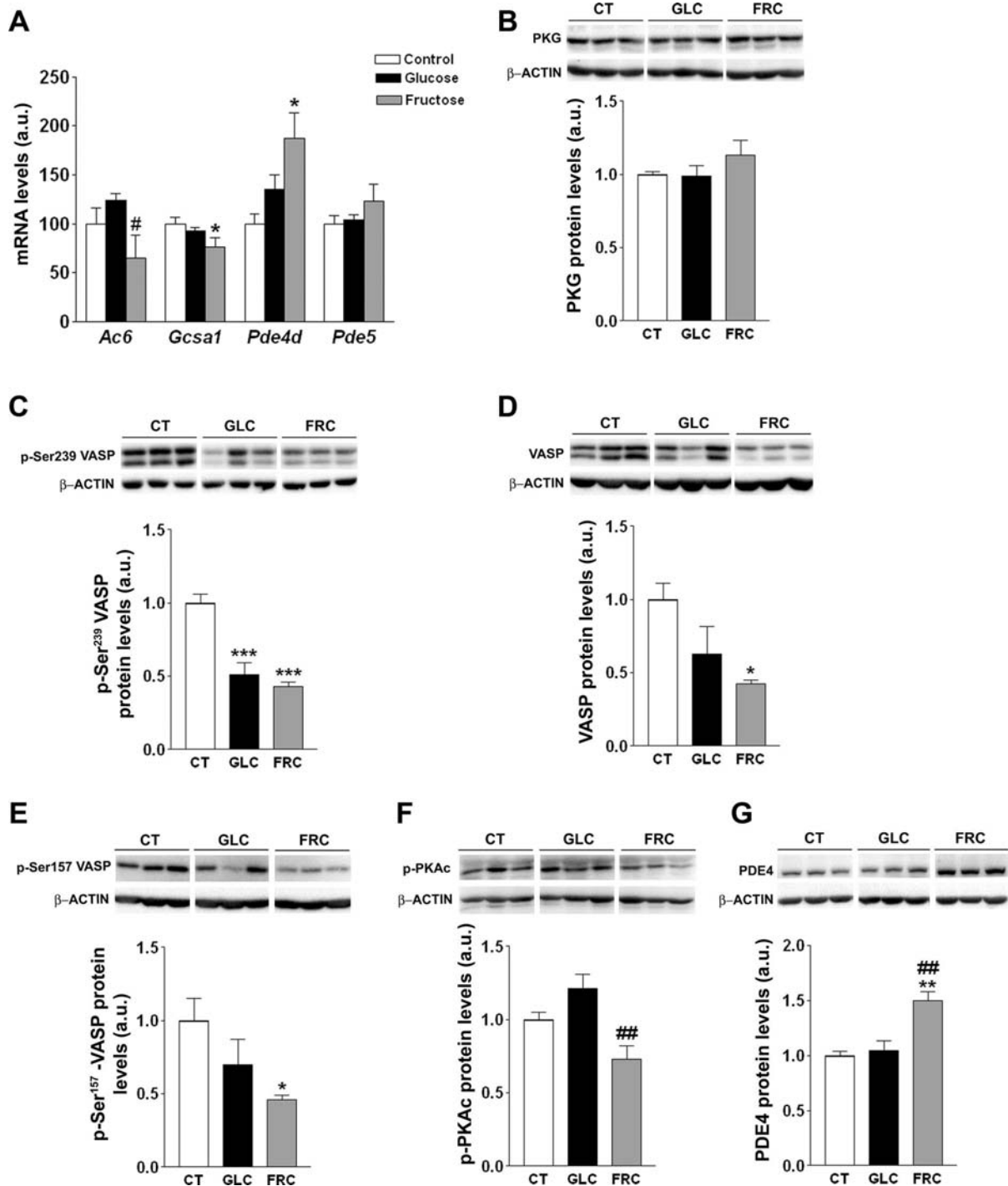


Fig. 8. Differential effects of fructose and glucose supplementation on intracellular pathways related to aortic relaxation. A: mRNA levels of adenylyl cyclase (*ac6*), soluble guanylate cyclase (*gcsa1*), phosphodiesterase 4 (*pde4d*), and phosphodiesterase 4 (*pde5*) in aortic tissue samples from control, glucose-, and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of values obtained from  $n = 8$  animals. Protein levels of cGMP-dependent protein kinase (PKG, B), vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylated in Ser<sup>239</sup> (C), total VASP (D), VASP phosphorylated in Ser<sup>157</sup> (E), phosphorylated protein kinase A (PKAc, F), and PDE4 (G) in aortic samples from control, glucose-, and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of values obtained from  $n = 5$  animals. To show representative bands corresponding to 3 different rats/treatment group, images from different parts of the same gel have been juxtaposed, which is indicated by white dividing lines. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  vs. control; # $P < 0.05$  and ## $P < 0.01$  vs. glucose. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

arteries of this group are likely the result of the elevated EDHF (rather than increased PGI<sub>2</sub>). Furthermore, we demonstrated that fructose but not glucose supplementation enhances PDE4 mRNA and protein expression (Fig. 8, A and G). The elevated PDE4 expression and subsequent reduction in cAMP levels may specifically hinder phosphorylation of VASP at Ser<sup>157</sup> (Fig. 8E). This effect combined with reduced VASP expression (Fig. 8D) possibly leads to an impairment of NO-independent relaxation in aortas of fructose-supplemented rats.

Another mechanism that could account for the difference between the response to ACh and SNP could be oxidative stress. Reactive oxygen species (ROS), particularly superoxide anions, inactivate NO, which could lead to a reduction of SNP potency. To examine this possibility, we measured the mRNA expression of the catalytic subunits of NADPH oxidase Nox1 and Nox4, major source of ROS in vascular cells (19). However, we did not see significant differences in the mRNA expression for Nox1 and Nox4 in the aorta of experimental animals (Table 4).

It has been shown that under metabolic stress conditions iNOS is able to produce an abnormal amount of NO leading to ROS production and decreased bioavailability of NO. Although we did not measure ROS production and NO bioavailability, we observed a significant induction of iNOS protein expression in aortic tissues from fructose-supplemented rats (Fig. 6B), which could in part lead to vascular dysfunction in this group (35). Vascular dysfunction in metabolic syndrome may also be associated with increased vasoconstrictor sensitivity (47). Here, however, we showed that fructose supplementation did not affect vasoconstrictor responses to PE. Along similar lines, no differences were reported in the vasoconstrictor responses to PE in mesenteric arteries (36) or aortic rings (23) from fructose-fed rats.

In conclusion, we have shown that dietary supplementation with liquid glucose or fructose causes metabolic and vascular alterations in female rats. Despite higher caloric intake in glucose-supplemented rats, fructose caused worse metabolic and vascular responses. This may be because of the elevated adiponectin level and the subsequent enhancement of PPAR $\alpha$  and eNOS phosphorylation in glucose-supplemented rats, a mechanism that is absent in the fructose group. Clearly, additional studies will be needed to document the direction and magnitude of these interactions in sugar-supplemented rats along with the relative importance of elevated adiponectin level to metabolic and vascular function in the glucose-supplemented rats.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Xiaoyuan Han for vascular expertise and Sereena Nand, the ACS Project SEED recipient, for assistance with the project. We also thank L. Herrero and D. Serra for the gift of the CPT-1A antibody.

#### GRANTS

This study was supported by grants from the Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, SAF2013-42982-R, and European Commission FEDER funds. G. Sangüesa was supported by a Formación de Profesorado Universitario grant from the Spanish Ministry of Science and Innovation and by an Agustí Pedro i Pons Foundation grant for postgraduate studies. We are a Consolidated Research Group of the Autonomous Government of Catalonia (SGR13-00066). This work was also supported in part by National Heart, Lung, and Blood Institute Grant HL-28988 to R. Rahimian and the University of the Pacific.

#### DISCLOSURES

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. The authors have no financial or other conflicts of interest to disclose.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

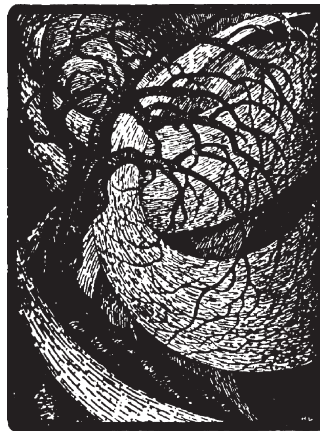
G.S. and S.S. were in charge of all experiments; F.A. contributed to vascular reactivity experiments; NR contributed to PCR/Western blot experiments and prepared the figures; J.C.L. helped in data interpretation and reviewed the manuscript; R.R. and M.A. designed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript.

#### REFERENCES

1. Agius L. High-carbohydrate diets induce hepatic insulin resistance to protect the liver from substrate overload. *Biochem Pharmacol* 85: 306–312, 2013. doi:10.1016/j.bcp.2012.09.019.
2. Akar F, Uludağ O, Aydın A, Aytekin YA, Elbeg S, Tuzcu M, Sahin K. High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: protective effect of resveratrol. *Food Chem Toxicol* 50: 2135–2141, 2012. doi:10.1016/j.fct.2012.03.061.
3. Alegret M, Roglans N, Laguna JC. Fructose consumption and leptin resistance: what have we learnt from animal studies? In: *Leptin: Hormonal Functions, Dysfunctions and Clinical Uses*, edited by Hemling RM, Belkin AT. Hauppauge, NY: Nova Science, 2011.
4. Aszódi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, Fässler R. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J* 18: 37–48, 1999. doi:10.1093/emboj/18.1.37.
5. Babacanoglu C, Yildirim N, Sadi G, Pektas MB, Akar F. Resveratrol prevents high-fructose corn syrup-induced vascular insulin resistance and dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* 60: 160–167, 2013. doi:10.1016/j.fct.2013.07.026.
6. Baena M, Sangüesa G, Dávalos A, Latasa M-J, Sala-Vila A, Sánchez RM, Roglans N, Laguna JC, Alegret M. Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the three major insulin-sensitive tissues. *Sci Rep* 6: 26149, 2016. doi:10.1038/srep26149.
7. Baena M, Sangüesa G, Hutter N, Sánchez RM, Roglans N, Laguna JC, Alegret M. Fructose supplementation impairs rat liver autophagy through mTORC activation without inducing endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta* 1851: 107–116, 2015. doi:10.1016/j.bbap.2014.11.003.
8. Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation* 94: 3341–3347, 1996. doi:10.1161/01.CIR.94.12.3341.
9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254, 1976. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
10. Bray GA, Popkin BM. Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: health be damned! Pour on the sugar. *Diabetes Care* 37: 950–956, 2014. doi:10.2337/dc13-2085.
11. Carpentier A, Taghibiglou C, Leung N, Szeto L, Van Iderstine SC, Uffelman KD, Buckingham R, Adeli K, Lewis GF. Ameliorated hepatic insulin resistance is associated with normalization of microsomal triglyceride transfer protein expression and reduction in very low density lipoprotein assembly and secretion in the fructose-fed hamster. *J Biol Chem* 277: 28795–28802, 2002. doi:10.1074/jbc.M204568200.
12. Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 278: 45021–45026, 2003. doi:10.1074/jbc.M307878200.
13. Csanyi G, Lepran I, Flesch T, Telegdy G, Szabo G, Mezei Z. Lack of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) up-regulation in endothelial dysfunction in aorta in diabetic rats. *Pharmacol Rep* 59: 447–455, 2007.
14. DeFronzo RA, Abdul-Ghani M. Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am J Cardiol* 108, Suppl: 3B–24B, 2011. doi:10.1016/j.amjcard.2011.03.013.
15. Deng G, Long Y, Yu Y-R, Li M-R. Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS pathway. *Int J Obes (Lond)* 34: 165–171, 2010. doi:10.1038/ijo.2009.205.
16. Develi-Is S, Ozen G, Bekpınar S, Topal G, Unerci Y, Dogan BSU, Uysal M. Resveratrol improves high-fructose-induced vascular dysfunction.

- tion in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 92: 1021–1027, 2014. doi:10.1139/cjpp-2014-0245.
17. **Gordon DA, Jamil H.** Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochim Biophys Acta* 1486: 72–83, 2000. doi:10.1016/S1388-1981(00)00049-4.
  18. **Han X, Shaligram S, Zhang R, Anderson L, Rahimian R.** Sex-specific vascular responses of the rat aorta: effects of moderate term (intermediate stage) streptozotocin-induced diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 94: 408–415, 2016. doi:10.1139/cjpp-2015-0272.
  19. **Han X, Zhang R, Anderson L, Rahimian R.** Sexual dimorphism in rat aortic endothelial function of streptozotocin-induced diabetes: possible involvement of superoxide and nitric oxide production. *Eur J Pharmacol* 723: 442–450, 2014. doi:10.1016/j.ejphar.2013.10.052.
  20. **Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G.** Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11259–11263, 1992. doi:10.1073/pnas.89.23.11259.
  21. **Herrero L, Rubí B, Sebastián D, Serra D, Asins G, Maechler P, Prentki M, Hegardt FG.** Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the beta-cell impairs glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 54: 462–471, 2005. doi:10.2337/diabetes.54.2.462.
  22. **Imamura F, O'Connor L, Ye Z, Mursu J, Hayashino Y, Bhupathiraju SN, Forouhi NG.** Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. *BMJ* 351: h3576, 2015. doi:10.1136/bmj.h3576.
  23. **Iyer SN, Katovich MJ.** Vascular reactivity to phenylephrine and angiotensin II in hypertensive rats associated with insulin resistance. *Clin Exp Hypertens* 18: 227–242, 1996. doi:10.3109/10641969609081766.
  24. **Jeon TI, Osborne TF.** SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 23: 65–72, 2012. doi:10.1016/j.tem.2011.10.004.
  25. **Jia G, Aroor AR, Whaley-Connell AT, Sowers JR.** Fructose and uric acid: is there a role in endothelial function? *Curr Hypertens Rep* 16: 434, 2014. doi:10.1007/s11906-014-0434-z.
  26. **Kahn R, Sievenpiper JL.** Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: we have, but the pox on sugar is overwrought and overworked. *Diabetes Care* 37: 957–962, 2014. doi:10.2337/dc13-2506.
  27. **Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ.** Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 113: 1888–1904, 2006. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.563213.
  28. **Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, Greenacre CB, Gwaltney-Bran S, McCrackin MA, Meyer R, Miller D, Shearer J, Yanong R.** *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals* 2013 Edition. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association, 2013.
  29. **Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B.** Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 116: 571–580, 2006. doi:10.1172/JCI27989.
  30. **Lorber D.** Importance of cardiovascular disease risk management in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7: 169–183, 2014. doi:10.2147/DMSO.S61438.
  31. **Mahmoud MF, El-Nagar M, El-Bassossy HM.** Anti-inflammatory effect of atorvastatin on vascular reactivity and insulin resistance in fructose fed rats. *Arch Pharm Res* 35: 155–162, 2012. doi:10.1007/s12272-012-0117-8.
  32. **Malik VS, Hu FB.** Fructose and cardiometabolic health: what the evidence from sugar-sweetened beverages tells us. *J Am Coll Cardiol* 66: 1615–1624, 2015. doi:10.1016/j.jacc.2015.08.025.
  33. **Mourmoura E, Vial G, Laillet B, Rigaudière J-P, Hininger-Favier I, Dubouchaud H, Morio B, Demaison L.** Preserved endothelium-dependent dilatation of the coronary microvasculature at the early phase of diabetes mellitus despite the increased oxidative stress and depressed cardiac mechanical function ex vivo. *Cardiovasc Diabetol* 12: 49, 2013. doi:10.1186/1475-2840-12-49.
  34. **Muniyappa R, Sowers JR.** Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord* 14: 5–12, 2013. doi:10.1007/s11154-012-9229-1.
  35. **Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, MacLeod KM.** Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2144–H2152, 2005. doi:10.1152/ajpheart.00591.2005.
  36. **Navarro-Cid J, Maeso R, Pérez-Vizcaíno F, Cachafeiro V, Ruilope LM, Tamargo J, Lahera V.** Effects of losartan on blood pressure, metabolic alterations, and vascular reactivity in the fructose-induced hypertensive rat. *Hypertension* 26: 1074–1078, 1995. doi:10.1161/01.HYP.26.6.1074.
  37. **Orellana-Gavaldà JM, Herrero L, Malandrino MI, Pañeda A, Sol Rodríguez-Peña M, Petry H, Asins G, Van Deventer S, Hegardt FG, Serra D.** Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology* 53: 821–832, 2011. doi:10.1002/hep.24140.
  38. **Pektas MB, Sadi G, Akar F.** Long-term dietary fructose causes gender-different metabolic and vascular dysfunction in rats: modulatory effects of resveratrol. *Cell Physiol Biochem* 37: 1407–1420, 2015. doi:10.1159/000430405.
  39. **Pereira MA.** Sugar-sweetened and artificially-sweetened beverages in relation to obesity risk. *Adv Nutr* 5: 797–808, 2014. doi:10.3945/an.114.007062.
  40. **Rahimian R, Laher I, Dube G, van Breemen C.** Estrogen and selective estrogen receptor modulator LY117018 enhance release of nitric oxide in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 116–122, 1997.
  41. **Rebollo A, Roglans N, Baena M, Padrosa A, Sánchez RM, Merlos M, Alegret M, Laguna JC.** Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats. *J Nutr Biochem* 25: 250–258, 2014. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.10.014.
  42. **Rebollo A, Roglans N, Baena M, Sánchez RM, Merlos M, Alegret M, Laguna JC.** Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1841: 514–524, 2014. doi:10.1016/j.bbailip.2014.01.002.
  43. **Roglans N, Vilà L, Farré M, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC.** Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats. *Hepatology* 45: 778–788, 2007. doi:10.1002/hep.21499.
  44. **Schäfer A, Burkhardt M, Vollkommer T, Bauersachs J, Münzel T, Walter U, Smolenski A.** Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta. *Biochem Pharmacol* 65: 397–405, 2003. doi:10.1016/S0006-2952(02)01523-X.
  45. **Sengupta P.** The laboratory rat: relating age with human's. *Int J Prev Med* 4: 624–630, 2013.
  46. **Shi Y, Ku DD, Man RYK, Vanhoutte PM.** Augmented endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxations attenuate endothelial dysfunction in femoral and mesenteric, but not in carotid arteries from type I diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 276–281, 2006. doi:10.1124/jpet.105.099739.
  47. **Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A, Okamura T.** Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension* 43: 255–262, 2004. doi:10.1161/01.HYP.0000111136.86976.26.
  48. **Sluik D, Engelen AI, Feskens EJ.** Fructose consumption in the Netherlands: the Dutch National Food Consumption Survey 2007–2010. *Eur J Clin Nutr* 69: 475–481, 2015. doi:10.1038/ejcn.2014.267.
  49. **Stanhope KL.** Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 53: 52–67, 2016. doi:10.3109/10408363.2015.1084990.
  50. **Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, Aiton A, Lewis GF, Adeli K.** Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem* 275: 8416–8425, 2000. doi:10.1074/jbc.275.12.8416.
  51. **Tappy L, Lê KA, Tran C, Paquot N.** Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition* 26: 1044–1049, 2010. doi:10.1016/j.nut.2010.02.014.
  52. **Tappy L, Lê KA.** Health effects of fructose and fructose-containing caloric sweeteners: where do we stand 10 years after the initial whistle blowings? *Curr Diab Rep* 15: 54, 2015. doi:10.1007/s11892-015-0627-0.
  53. **Vartanian LR, Schwartz MB, Brownell KD.** Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *Am J Public Health* 97: 667–675, 2007. doi:10.2105/AJPH.2005.083782.
  54. **Vilà L, Rebollo A, Adalsteisson GS, Alegret M, Merlos M, Roglans N, Laguna JC.** Reduction of liver fructokinase expression and improved hepatic inflammation and metabolism in liquid fructose-fed rats after

- atorvastatin treatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 251: 32–40, 2011. doi:10.1016/j.taap.2010.11.011.
55. Vilà L, Roglans N, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology* 48: 1506–1516, 2008. doi:10.1002/hep.22523.
56. Vilà L, Roglans N, Perna V, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Alegret M, Laguna JC. Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose. *J Nutr Biochem* 22: 741–751, 2011. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.06.005.
57. Xu X, So J-S, Park J-G, Lee A-H. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin Liver Dis* 33: 301–311, 2013. doi:10.1055/s-0033-1358523.
58. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 278: 2461–2468, 2003. doi:10.1074/jbc.M209033200.
59. Yang Q, Zhang Z, Gregg EW, Flanders WD, Merritt R, Hu FB. Added sugar intake and cardiovascular diseases mortality among US adults. *JAMA Intern Med* 174: 516–524, 2014. doi:10.1001/jamainternmed.2013.13563.
60. Yousif MH, Oriowo MA, Williams KI. Sodium nitroprusside-induced cGMP-independent vasodilator responses in the perfused rabbit ovarian vascular bed. *Pharmacol Res* 38: 381–386, 1998. doi:10.1006/phrs.1998.0385.





## Liquid fructose in Western-diet-fed mice impairs liver insulin signaling and causes cholesterol and triglyceride loading without changing calorie intake and body weight<sup>☆,☆☆</sup>

Miguel Baena<sup>a,b,1</sup>, Gemma Sangüesa<sup>a,b,1</sup>, Natalia Hutter<sup>a</sup>, José María Beltrán<sup>a</sup>, Rosa María Sánchez<sup>a,b,c</sup>,  
Núria Roglans<sup>a,b,c</sup>, Marta Alegret<sup>a,b,c,\*</sup>, Juan Carlos Laguna<sup>a,b,c,\*</sup>, 1

<sup>a</sup>Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, Spain

<sup>b</sup>Institute of Biomedicine University of Barcelona, Spain

<sup>c</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROm), Spain

Received 14 June 2016; received in revised form 24 October 2016; accepted 27 October 2016

### Abstract

**Background/objectives:** Liquid fructose associates with prevalence of type 2 diabetes mellitus and obesity. Intervention studies suggest that metabolically unfit individuals are more responsive than healthy individuals to liquid fructose. We determined whether mice consuming an obesogenic Western diet were more responsive than chow-fed mice to the alterations induced by liquid fructose supplementation (LFS).

**Methods:** C57BL/6N mice were fed chow or Western diet  $\pm$  *ad libitum* 15% fructose solution for 12 weeks. Food and liquid intake and body weight were monitored. Plasma analytes and liver lipids, histology and the expression of genes related to lipid handling, endoplasmic reticulum stress, inflammation and insulin signaling were analyzed.

**Results:** Western diet increased energy intake, visceral adipose tissue (vWAT), body weight, plasma and liver triglycerides and cholesterol, and inflammatory markers in vWAT vs. chow-fed mice. LFS did not change energy intake, vWAT or body weight. LFS significantly increased plasma and liver triglycerides and cholesterol levels only in Western-diet-fed mice. These changes associated with a potentiation of the increased liver expression of PPAR $\gamma$  and CD36 that was observed in Western-fed mice and related to the increased liver mTOR phosphorylation induced by LFS. Furthermore, LFS in Western-diet-fed mice induced the largest reduction in liver IRS2 protein and a significant decrease in whole-body insulin sensitivity.

**Conclusions:** LFS in mice, in a background of an unhealthy diet that already induces fatty liver visceral fat accretion and obesity, increases liver lipid burden, hinders hepatic insulin signaling and diminishes whole-body insulin sensitivity without changing energy intake.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** ChREBP; IRS2; PPAR $\gamma$ ; CD36; mTOR; Visceral adipose tissue; Leptin

### 1. Introduction

Epidemiological studies indicate that the increased consumption of sugar-sweetened beverages is one of the key lifestyle modifications

\* This work was supported by grants from the Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, the Ministry of Economy and Competition (SAF2013-42982-R) and European Commission FEDER funds. Miguel Baena and Gemma Sangüesa were supported by FPI and FPU grants, respectively, from the Spanish Ministry of Science and Innovation. We are a Consolidated Research Group of the Autonomous Government of Catalonia (SGR13-00066).

\*\* We declare no potential conflict of interest, including related consultancies, shareholdings and funding.

\* Corresponding authors at: Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, Avda. Joan XXIII s.n. Barcelona 08028, Spain. Tel: +34 93 402 4530.

E-mail addresses: [alegret@ub.edu](mailto:alegret@ub.edu) (M. Alegret), [jclagunae@ub.edu](mailto:jclagunae@ub.edu) (J.C. Laguna).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

that occurred in the last decades that is associated to the increased prevalence of metabolic diseases, such as type 2 diabetes mellitus (T2DM) and obesity, in human populations all over the world [1,2]. Epidemiological studies in humans rely on data obtained from populations with a broad spectrum of genetic predisposition to metabolic diseases and highly varied dietary patterns. In addition, intervention studies in humans, although limited in duration and the number of participants, indicate that metabolically unfit individuals, for example, obese people, are more responsive than healthy people to the metabolic alterations induced by fructose ingestion [3–5]. Given the difficulties in performing intervention studies in humans in terms of design, cost and ethics, there is intense debate over the interpretation of these epidemiological studies on whether they are just merely detecting metabolic disturbances associated with excessive calorie intake or reflecting specific deleterious effects related to the way these calories are provided (liquid beverages), the very nature of the simple sugars used (fructose, glucose, sucrose, etc.) or the combination of both.

Using healthy rodents maintained on solid diets supplemented with liquid solutions of simple sugars has shown that fructose consumption, when compared to equicaloric amounts of glucose consumption, is unique in inducing specific metabolic disturbances in the liver by affecting fatty acid metabolism and insulin signaling pathways [6,7]. Further, we have previously shown that liquid fructose supplementation, at a concentration below 30% (weight/volume) that has been shown to significantly alter intestinal permeability [8,9], significantly increased atherosclerosis and liver and plasma lipid content in LDLR<sup>-/-</sup> mice fed Western-type diet despite ingesting exactly the same amount of calories as LDLR<sup>-/-</sup> mice on Western-type diet only [10]. As these transgenic animals already presented a large fat deposition in the liver even when raised with standard rodent chow, we sought to investigate the metabolic response to the combined Western-diet feeding and liquid fructose supplementation in the background wild-type mice lineage used to generate the transgenic LDLR<sup>-/-</sup> mice we have previously used.

Here we show in a mouse model susceptible to diet-induced metabolic disturbances, the C57BL/6N mouse, that liquid fructose supplementation increases liver cholesterol and triglyceride burden, hinders hepatic insulin signaling and diminishes whole-body insulin sensitivity in mice with an unhealthy, Western-style solid diet that already induces fatty liver, visceral fat accretion and obesity. Fructose elicited these changes without affecting the total amount of energy consumed, as fructose-supplemented animals reduced their solid food intake to accommodate the ingested liquid calories.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and experimental design

Male mice (C57BL/6N) were purchased from Charles River (France) and maintained with water and food *ad libitum* at constant humidity and temperature with a light/dark cycle of 12 h. After 3 weeks of acclimatizing, animals were randomly separated into 4 groups of 12 mice each which received (a) control rodent diet without supplementary sugar: control group (C), (b) control rodent diet supplemented with 15% weight/volume fructose in drinking water: fructose-supplemented group (F), (c) Western-type diet without supplementary sugar: Western group (W) and (d) Western-type diet supplemented with 15% weight/volume fructose in drinking water: Western plus fructose group (W+F). The composition of control (2018 Teklad Global 18% protein, Harlan Laboratories) and Western-type (D12079B Open Source Diets, Research Diets, Inc.) diets was as detailed previously [10]. During a feeding period of 12 weeks, consumed food and beverage were measured every 2 days and body weight once a week. At the end of the study, animals were sacrificed under intraperitoneal ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg) anesthesia between 9 and 10 a.m. after being fasted for 2 h. All procedures were conducted in accordance with the guidelines established by the University of Barcelona's Bioethics Committee, as stated in Law 5/1995 (21st July) from the Generalitat de Catalunya. These guidelines follow the Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.

### 2.2. Sample preparation

Blood samples were obtained by intracardiac puncture at the time of death and collected in microtubes containing anticoagulant as additive (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany). Plasma was obtained by centrifugation and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. Liver and visceral adipose tissues were excised and fractionated. Ten to 100 mg were immediately frozen in liquid  $\text{N}_2$  and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used for protein and total RNA extraction. Another portion for hepatic histological analysis was obtained. An additional section of liver tissue (100 mg) was perfused and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for quantifying liver lipids content. Total and nuclear protein extracts from liver and visceral adipose tissue were isolated by the Helenius method [11], and protein concentrations were determined by the Bradford method [12].

### 2.3. Glucose, lipids, cholesterol, insulin and leptin analysis

Plasma glucose, triglycerides and cholesterol levels were measured using an Accutrend Plus System glucometer (Roche Farma, Barcelona, Spain). Plasma leptin and insulin levels were determined at the end of treatment using the EZRL-83K and EZRMI-13K kits from Millipore (Billerica, MA, USA), respectively. Insulin sensitivity index (ISI) was calculated as described by Qu et al. [13].

Liver lipids were extracted according to the Bligh and Dyer [14] method using the homogenate fraction. The lipid extract was evaporated under a stream of nitrogen gas and dissolved in absolute ethanol. Triglycerides and cholesterol contents in liver were

determined by using colorimetric tests: Triglycerides-LQ no. 41030 and Cholesterol CHOD-POD no. 1001091 from Spinreact (Girona, Spain), respectively.

### 2.4. RNA isolation and quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR)

Total RNA was isolated from 60 mg of liver and adipose tissue using Trizol reagent (Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific Inc., MA, USA) in accordance with the manufacturer's guidelines. Single-stranded cDNA was synthesized by mixing 1  $\mu\text{g}$  of liver total RNA, 125 ng of random hexamers (Roche Farma, SA, Madrid, Spain) as primers in the presence of 5 $\times$  First-Strand Buffer, 10 mM dithiothreitol, 200 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT, Invitrogen), 20 U of RNase OUT from Invitrogen and 0.5 mM of each dNTP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a total volume of 20  $\mu\text{l}$ . Samples were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 60 min in MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The PCR was carried out in StepOnePlus Real-Time PCR System Thermal Cycling Block (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Twenty microliters of reaction mixture contained Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 100 nM of each specific primer (including forward and reverse primers) and 20 ng of cDNA for each gene. After an initial denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, 40 cycles of amplification were done. PCRs were performed in duplicate and normalized to a housekeeping gene, the TATA box binding protein (*tbp*) gene, using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method. The GenBank number, primer sequences and PCR product length are listed in Table 1.

### 2.5. Western blot analysis

Thirty micrograms of different protein fractions from rat livers were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were then transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride transfer membranes (Millipore, Billerica, MA, USA), blocked for 1 h at room temperature with 5% nonfat milk solution in 0.1% Tween-20-Tris-buffered saline (TBS) and incubated as described previously [6]. Detection was performed using the ECL chemiluminescence kit for HRP (Amersham GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain). To confirm the uniformity of protein loading, blots were incubated with  $\beta$ -tubulin or  $\beta$ -actin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as a control. Primary antibodies for phospho- and total mTOR were supplied by Millipore (Billerica, MA, USA), those for phospho- and total IRE1 were obtained from Abcam (Cambridge, UK), and the antibody against phospho- and total JNK were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). The rest of the antibodies used were from Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA).

### 2.6. Histological analysis

For hepatic histological analysis of Oil-Red-O-stained sections, the liver tissue was perfused and fixed in 10% paraformaldehyde solution before processing for paraffin embedding. Images were acquired with an Olympus BX71 microscope equipped with a DP72 camera and analyzed by a registered pathologist at BioBanc (Banc de tumors-IDIBAPS, Barcelona Spain) who was unaware of the treatment groups. The area of positive staining for Oil Red O was calculated as a percentage of stained cells/total section area in each sample. Eight-micrometer serial sections of liver segments obtained in a cryostat (Leyca CM-1900) at  $-24^{\circ}\text{C}$  were prepared and stained with hematoxylin-eosin stain for histological evaluation of inflammatory structures. Lesion area was quantified following the standard procedure by using Image-J software.

### 2.7. Enzyme activity assays

Hepatic fatty acid  $\beta$ -oxidation activity was determined in mice livers as previously described [15] with 30  $\mu\text{g}$  of postnuclear supernatant.

### 2.8. Statistical methods

Results are expressed as the mean of  $n$  values  $\pm$  standard deviation (SD). Plasma and lipid samples were assayed in duplicate. Significant differences between values from control, fructose and Western groups were established by the one-way analysis of variance test and Bonferroni posttest for selected comparisons; significant differences between values from Western and Western+fructose groups were established by the unpaired  $t$  test (GraphPad Software V5). The level of statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Fructose supplementation did not change calorie intake, visceral adipose tissue amount and body weight

After 12 weeks of intervention, total calorie intake significantly increased in Western-diet-fed vs. normal chow-fed mice ( $\times 1.27$ -fold) but was not modified by supplementation with liquid fructose. Mice ingesting the 15% w/v fructose solution compensated for the ingested liquid calories by reducing the ingestion of the solid normal ( $\times 0.72$ -

Table 1  
Primers used for reverse transcriptase PCR<sup>a</sup>

Gene	GenBank no.	Primer sequences	PCR product
<i>Fos</i>	NM_010234.2	Forward: 5'-TACTACCATTCCCAGCCGA-3' Reverse: 5'-GCTGTACCCGTGGGATAAA-3'	113 bp
<i>Ccr2</i>	NM_009915.2	Forward: 5'-AGAGGTCTCGGTGGTTGT-3' Reverse: 5'-CACTGTCTTTGAGGCTTTGTC-3'	100 bp
<i>Cd36</i>	NM_001159558.1	Forward: 5'-CCAAGCTATTGCGACATGATTAAT-3' Reverse: 5'-CAATGTCGAGACTTTCAACAAA-3'	75 bp
<i>Chop</i>	NM_007837.4	Forward: 5'-TATCTATCCCCAGAAACG-3' Reverse: 5'-GGGCACTGACCACTCTGTTT-3'	219 bp
<i>Dgat2</i>	NM_026384.3	Forward: 5'-GCACAGACTGTGGCTGATA-3' Reverse: 5'-TTTCTTGGGCGTGTCCAGT-3'	71 bp
<i>Dnajb9</i>	NM_013760.4	Forward: 5'-TCTGCCTCAGAGCGACAAAT-3' Reverse: 5'-TCCGACTATTGGCATCCGAG-3'	145 bp
<i>Edem1</i>	NM_138677.2	Forward: 5'-CCAGCATGGGCTTCTACCAG-3' Reverse: 5'-CCTTGGCCGATGAAGCCAG-3'	119 bp
<i>F4/80</i>	XM_011246272.1	Forward: 5'-GGAGGACTTCTCAAGCTATT-3' Reverse: 5'-GGCTCTCAGACTTCTGCTT-3'	69 bp
<i>Fasn</i>	NM_007988.3	Forward: 5'-TCTGGAAACGAGAACACGATCT-3' Reverse: 5'-GAGACGTGTCACTCTGGACTTG-3'	138 bp
<i>Gadd34</i>	NM_008654.2	Forward: 5'-TGCAGGGGCTGATAAGAGG-3' Reverse: 5'-ATTCTCAGCTGGACCCCT-3'	104 bp
<i>Grp78</i>	NM_001163434.1	Forward: 5'-ATTGGAGGTGGGCAACCAA-3' Reverse: 5'-TCGCTGGCATCATTGAAGT-3'	150 bp
<i>Grp94</i>	NM_011631.1	Forward: 5'-GACCTTCGGTTCGTCAGAG-3' Reverse: 5'-AGCCTTCTCGGCTTTTACC-3'	83 bp
<i>Il-6</i>	NM_001314054.1	Forward: 5'-ACATGTTTCTCTGGGAAATCGT-3' Reverse: 5'-AAGTGCATCATCGTTTTCATACA-3'	84 bp
<i>Ccl2</i>	NM_011333.3	Forward: 5'-GCTGGAGAGCTACAAGAGGATCA-3' Reverse: 5'-CTCTCTTGGAGCTTGGTACAAA-3'	79 bp
<i>Myd88</i>	NM_010851.2	Forward: 5'-AGGCGATGAAGAAGGACTTCC-3' Reverse: 5'-TCAGTCTCATCTTCCCTCTGC-3'	163 bp
<i>Lep</i>	NM_008493.3	Forward: 5'-AACCTCATCAAGACCATGTCA-3' Reverse: 5'-CCTCTGCTTGGCGGATACC-3'	73 bp
<i>LepR</i>	NM_146146.2	Forward: 5'-AACTGCAGTCTTCGGGGATG-3' Reverse: 5'-ACTGAAACTCACACCGCA-3'	109 bp
<i>Pparγ</i>	XM_006505737.1	Forward: 5'-GCCACCAACTTCGGAATC-3' Reverse: 5'-TCGAGTGGCTTCCATCAC-3'	57 bp
<i>Scd1</i>	NM_009127.4	Forward: 5'-TTCTTATCATGCCAACCATC-3' Reverse: 5'-TGGGCGCGGTGATCTC-3'	71 bp
<i>Tlr4</i>	NM_021297.2	Forward: 5'-AACTCCTCGCTAGGACTCTGA-3' Reverse: 5'-TCTGATCCATGCATTGGTAGGT-3'	114 bp
<i>Tnfα</i>	NM_013693.3	Forward: 5'-GAAAGCAAGCAGCCAAACA-3' Reverse: 5'-CGGATCATGCTTTCTGTGCTC-3'	106 bp
<i>Tbp</i>	NM_013684.3	Forward: 5'-TGCCACACCAGCTTCTGAGA-3' Reverse: 5'-TTTACAGCAAGATTACCGGTAGA-3'	79 bp

<sup>a</sup> All primers have been used at an efficiency between 85% and 110%.

fold) or Western diet ( $\times 0.82$ -fold) food. Only mice consuming the Western diet displayed increased final body weight ( $\times 1.29$  vs. control) and visceral adipose tissue (vWAT) amount ( $\times 2.48$  vs. control, as a percentage of body weight) (Table 2). Despite that, the solid Western diet and liquid fructose supplementation induced hyperleptinemia ( $\times 5.50$  and  $\times 2.29$ , respectively) versus normal chow-fed mice values (Fig. 1A) and increased expression of the *lep* gene in vWAT (Fig. 1B). The sustained hyperleptinemia probably resulted in a state of peripheral leptin resistance, as liver expression of the SOCS-3 protein, an endogenous inhibitor of leptin signaling [16], was also increased in solid Western-diet-fed mice and liquid-fructose-supplemented mice (Fig. 1C). Accordingly, liver *fos* expression, which is controlled by leptin activity, was decreased, while the expression of the long form of the leptin receptor was increased [17] (Fig. 1D and E).

### 3.2. Fructose supplementation did not result in hypertriglyceridemia or worsened histological signs of fatty liver

There is a wealth of information describing the induction of hypertriglyceridemia and fatty liver by fructose supplementation in rats and humans [3,18–20]. However, in our study, liquid fructose supplementation in C57BL/6N mice consuming either control or a

Western diet did not induce hypertriglyceridemia or worsened fatty liver (Fig. 2A–B). Although fructose supplementation in Western diet mice significantly increased liver triglyceride accretion (Fig. 2C), histological analysis of Oil-Red-O-stained sections (Fig. 2B) showed exactly the same lipid percent area for Western-diet-fed mice, irrespective of fructose supplementation ( $11 \pm 12$ ,  $12 \pm 3$ ,  $100 \pm 0$  and  $100 \pm 0$  lipid percent area, expressed as mean  $\pm$  SD, for control, fructose, Western and Western+fructose groups;  $n=4$  for each group). Accordingly, the amount of the lipogenic transcription factors SREBP1c (mature form) and ChREBP in liver nuclear extracts was not increased by fructose supplementation (Fig. 2D and E). The same was observed with the hepatic expression of lipogenic enzymes (Fig. 2F) (*dgat2*, *scd1* and *fasn*). The lack of a clear lipogenic effect was not due to a deficit in fructose incorporation into liver metabolism, as fructokinase levels were increased in the livers of fructose-supplemented mice (Fig. 2G). Fructose is known for inducing its own metabolism by increasing the expression of the enzyme fructokinase [21].

### 3.3. Fructose supplementation potentiated the hepatic cholesterol burden in mice fed a solid Western diet

As the Western diet used in our experimental protocol contained 0.21% of cholesterol, mice consuming this diet showed hypercholesterolemia and increased cholesterol deposition in liver tissue (Fig. 3A and B). In addition, diets rich in saturated fat, like the Western diet used in the present work, are known to induce hypertriglyceridemia and fatty liver (Fig. 2) through the increased hepatic expression of the nuclear receptor *ppary* and one of its target genes, *cd36* (Fig. 3C and D), a fatty acid translocase [22]. Fructose supplementation did not modify liver fatty acid  $\beta$ -oxidation activity (Fig. 3E). Surprisingly, despite not affecting fatty acid synthesis and catabolism, liquid fructose supplementation potentiated the increase of *ppary* and *cd36* expression, as well as liver triglyceride and cholesterol accretion, in Western-diet-fed mice (Figs. 2 and 3). This was observed despite a significant reduction in the amount of the solid diet and thus dietary cholesterol consumed by these mice (see above and Table 2). In accordance with our previous results obtained in fructose-supplemented rats [23], only fructose-supplemented mice showed increased liver mTOR phosphorylation (Fig. 3F).

Table 2

Intake values (solid chow and supplemented beverage) and zoometric parameters for C, F, W and W+F expressed as mean  $\pm$  SD of the values obtained from at least eight different animals

Parameter	C	F	W	W+F
AUC <sup>a</sup> beverage (ml per mice per 12 weeks)	374 $\pm$ 57	524 $\pm$ 35	246 $\pm$ 29	312 $\pm$ 14
AUC <sup>a</sup> solid (g per mice per 12 weeks)	274 $\pm$ 31	197 $\pm$ 13	230 $\pm$ 17	197 $\pm$ 10
Ingested kcal from liquid	0 kcal	314 $\pm$ 21	0 kcal	187 $\pm$ 8
Ingested kcal from solid	852 $\pm$ 94	611 $\pm$ 41	1080 $\pm$ 77	925 $\pm$ 49
Total ingested calories	852 $\pm$ 94	925 $\pm$ 22	1080 $\pm$ 37	1113 $\pm$ 44
AUC <sup>a</sup> body weight (g per mice per 12 weeks)	318.8 $\pm$ 21.5	315.8 $\pm$ 21.9	369.2 $\pm$ 26.5	358.3 $\pm$ 33.9
Final body weight (BW) (g)	28.8 $\pm$ 1.7	29.5 $\pm$ 2.9	37.1 $\pm$ 3.6	37.1 $\pm$ 4.7
vWAT weight (g)	0.8 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.8
% vWAT/BW	3.2 $\pm$ 0.06	4.2 $\pm$ 0.9	7.8 $\pm$ 1.3	7.7 $\pm$ 1.3
Liver weight (g)	1.4 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.5

Statistical significance (*P* values vs. control group, if not indicated) and fold change are shown when appropriate.

<sup>a</sup> Area under the curve.

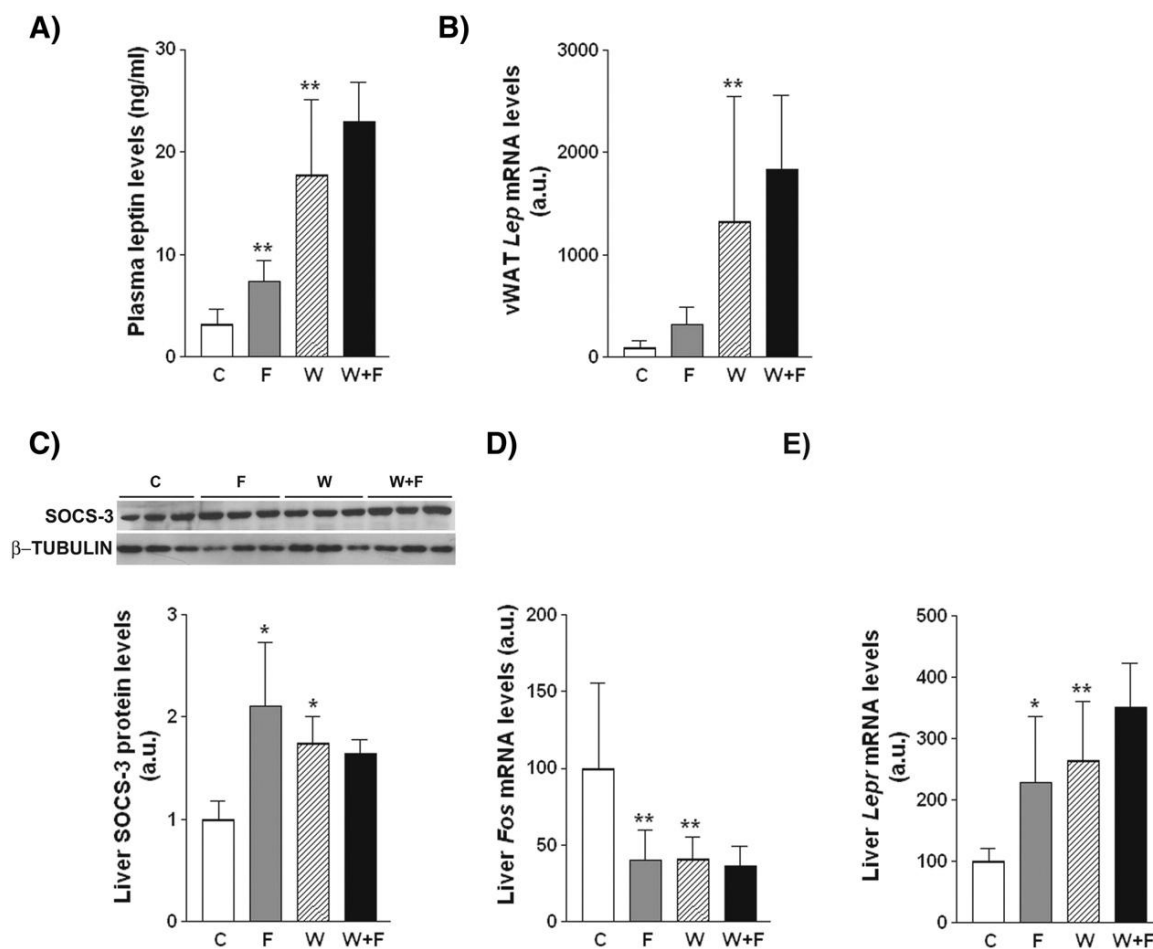


Fig. 1. Plasma leptin (A) and mRNA levels of *lep* gene in visceral adipose tissue (B) from C (mice fed standard solid chow), F (mice fed standard solid chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*), W (mice fed Western solid chow), and W+F (mice fed Western solid chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*) expressed as mean (a.u., arbitrary units)  $\pm$ SD of the values obtained from eight animals. (C) Western blot of SOCS-3 protein in liver samples obtained from the four experimental dietary groups of mice represented as the mean  $\pm$ SD of three to four different samples. Representative bands correspond to three different mice in each group. Bar plots showing the relative levels of *fos* (D) and *lepr* (E) mRNAs from C, F, W and W+F groups (mean  $\pm$ SD of four to six different liver samples). \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$  vs. C values.

#### 3.4. Inflammation was present, mainly in visceral adipose tissue, in mice consuming a solid Western diet irrespective of liquid fructose supplementation

Western diet consumption over 12 weeks increased the expression of *f4/80*, a marker of macrophage infiltration and inflammatory markers, such as *ccl2* and *il-6*, in mouse vWAT (Fig. 4A). Although there was a tendency to increased expression of inflammatory markers in the livers of Western-diet-fed mice, this was not statistically significant (Fig. 4B). Liver nuclear expression of p65 (Fig. 4C) and histological analysis of liver samples (Fig. 4D) confirmed the lack of a clear inflammatory process in this tissue. The expression of inflammatory markers activated by bacterial endotoxins, such as *tlr4* or *myd88*, was not changed in the liver or adipose tissue of these mice. Moreover, fructose supplementation did not modify the expression of inflammatory markers, except in the cases of *tnf $\alpha$*  and the chemokine receptor *ccr2*, which were significantly

increased in vWAT when compared to the levels in mice consuming a solid Western diet only.

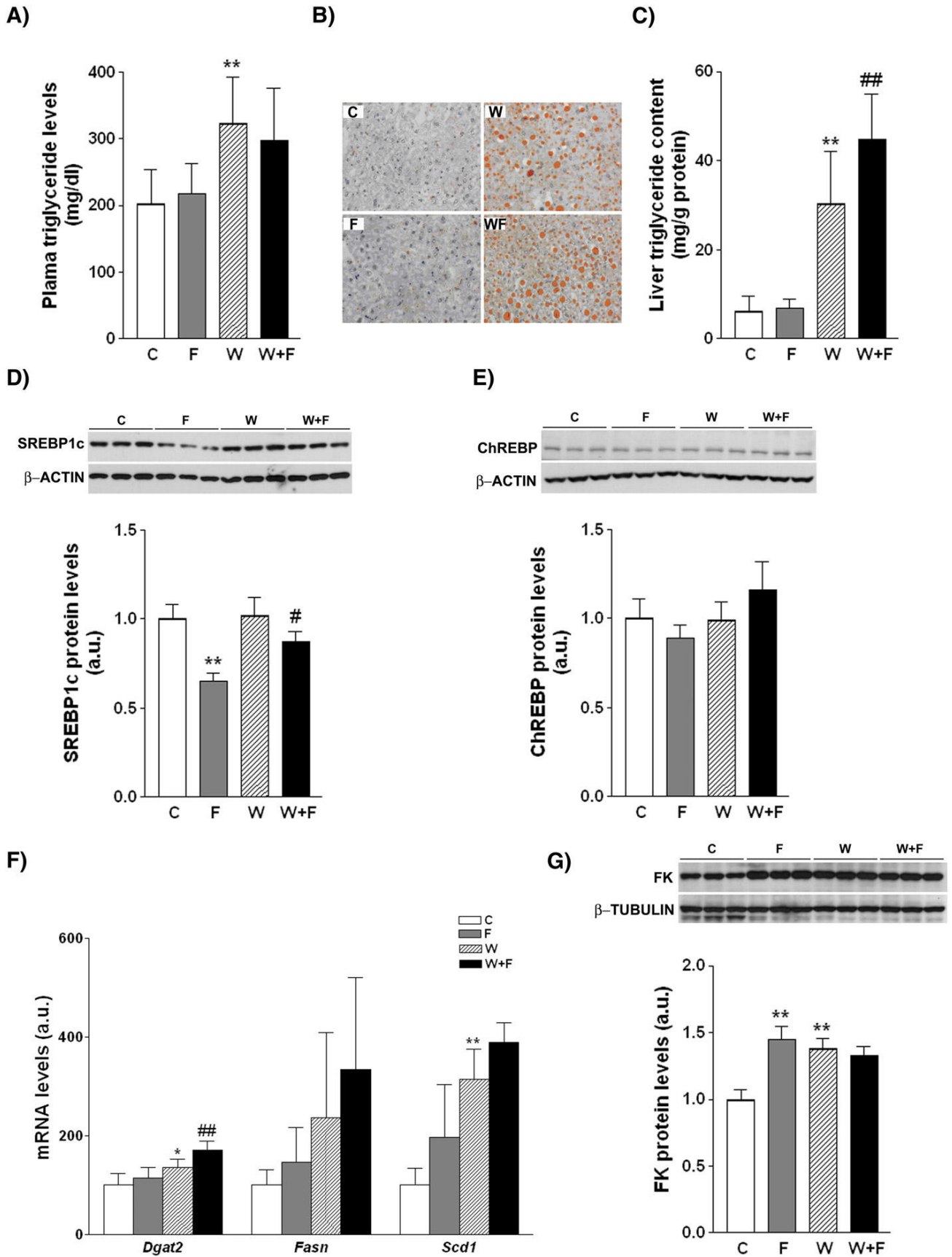
#### 3.5. Endoplasmic reticulum stress was not activated by any dietary intervention

We have previously shown that fructose supplementation in rats does not activate the endoplasmic reticulum stress (ERS) response [23]. In the present study, neither liquid fructose supplementation nor Western diet consumption affected the activation state of the PERK and ATF6 branches of the ERS response (Fig. 5A and B). Consequently, the expression of the target genes for activated PERK and ATF6 transcription factors was not changed or even decreased (Fig. 5C).

Phosphorylation and activation of IRE-1 were increased by Western diet consumption and, similar to our previous observations in fructose-supplemented rats [23], liquid fructose supplementation

Fig. 2. Plasma triglyceride levels (A) from C, F, W and W+F mice (mean  $\pm$ SD of four to six different samples). (B) Representative liver sections stained with Oil Red O from each experimental group. (C) Liver triglyceride levels from the four experimental dietary groups of mice (mean  $\pm$ SD of four to six different samples). Western blot of SREBP1c (D) and ChREBP (E) proteins in nuclear liver samples from the four experimental groups of mice. Representative bands correspond to three different mice in each group; bar plots show the level of the protein expressed as the mean (a.u.)  $\pm$ SD of the values obtained from three to four animals. (F) Bar plots showing the relative levels of specific mRNAs from the four experimental dietary groups of mice (mean  $\pm$ SD of four to six different liver samples). (G) Western blot of fructokinase (FK) protein in liver samples obtained from C, F, W and W+F groups. Representative bands corresponding to three different mice in each group are shown; bar plots show the level of the protein expressed as the mean  $\pm$ SD of the values obtained from three to four animals. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$  vs. C values; ## $P < .01$  vs. W values.





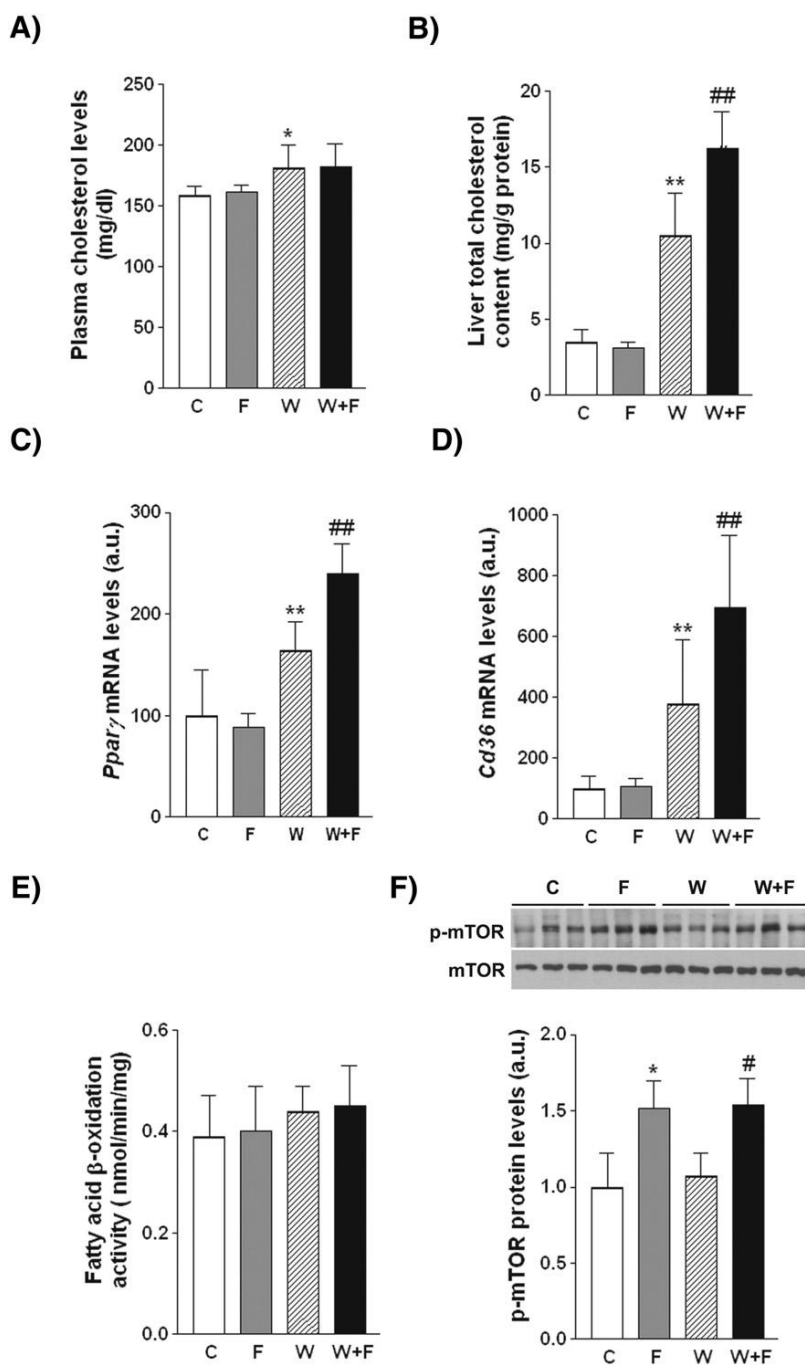


Fig. 3. Plasma (A) and liver (B) cholesterol levels from from C, F, W and W+F mice (mean $\pm$ SD of four to six different samples). Bar plots showing the relative levels of *ppary* (C) and *cd36* (D) mRNAs from the four experimental dietary groups of mice (mean $\pm$ SD of four to six different liver samples). Fatty acid  $\beta$ -oxidation activity in liver samples obtained from C, F, W and W+F groups represented as the mean $\pm$ SD of the values obtained from four to six animals. (F) Western blot of phospho- and total mTOR protein in liver samples obtained from the four experimental dietary groups of mice. Representative bands corresponding to three different mice in each group are shown; bar plots show the level of the protein expressed as the mean $\pm$ SD of the values obtained from three to four animals. \* $P$ <.05, \*\* $P$ <.01 vs. C values; #  $P$ <.05, ##  $P$ <.01 vs. W values.

(Fig. 5D). However, this activation did not translate into an increased expression of the spliced XBP1 (XBP1s) transcription factor in all the dietary intervention groups (Fig. 5E), as demonstrated by the unaltered or even decreased expression of XBP1s target genes (Fig. 5C). Moreover, there was no clear increase in the activated, phosphorylated form of JNK (Fig. 5F).

### 3.6. Only the combination of a Western diet and liquid fructose supplementation significantly reduced the ISI in mice

No dietary intervention significantly modified plasma glucose (Fig. 6A) and insulin (Fig. 6B) concentrations, although mice fed a Western diet showed a tendency towards increased glucose and insulin levels, an

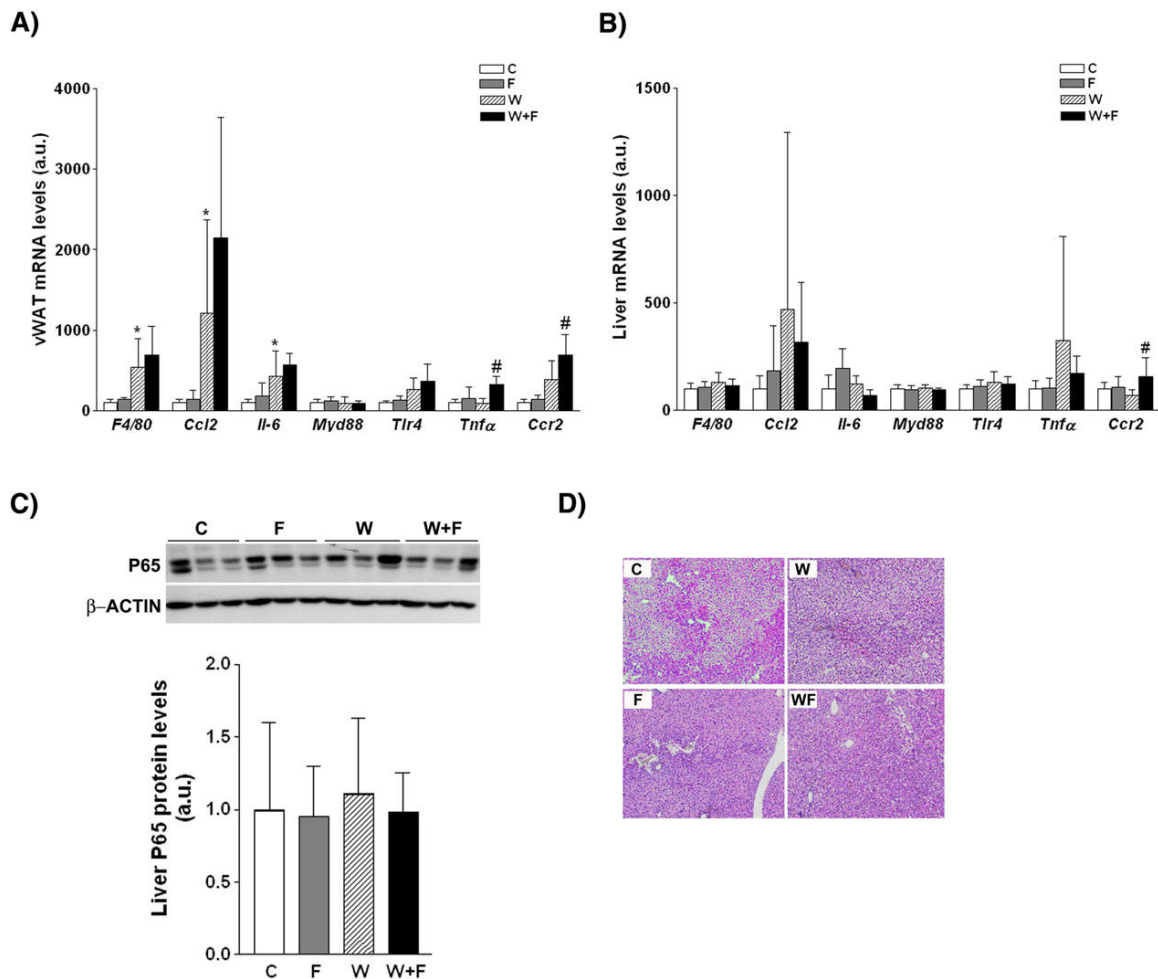


Fig. 4. Bar plots showing the relative levels of specific mRNAs from from C, F, W and W+F mice represented as mean (a.u.) $\pm$ SD of four to six different visceral adipose tissue (A) or liver (B) samples. Western blot of p65 protein in liver samples obtained from C, F, W and W+F groups (C). Representative bands corresponding to three different mice in each group are shown; bar plot shows the level of the protein expressed as the mean $\pm$ SD of the values obtained from three to four animals. (D) Representative hematoxylin–eosin liver sections from C, F, W and W+F groups. # $P$ <.05 vs. W values.

effect that was further magnified with liquid fructose supplementation. As a consequence, the ISI was only significantly reduced in the Western-diet-fed mice supplemented with fructose (W+F mice) (Fig. 6C). We have previously shown that liquid fructose supplementation reduces rat liver IRS2 protein content [24,25]. As IRS2 is a key molecule in the insulin signaling pathway [26], we measured IRS2 protein levels in our liver samples. We found a progressive reduction in IRS2 protein levels across the different intervention dietary groups that was significant in Western-fed mice, further increased to less than half the value present in controls in W+F animals (Fig. 6D).

#### 4. Discussion

Epidemiological studies in humans point to the high consumption of fructose-enriched beverages as a key factor in the development of obesity, T2DM and associated cardiovascular comorbidities. Here we show in an experimental dietary intervention model, the C57BL/6N mouse, whose metabolism is responsive to dietary manipulation that liquid fructose supplementation promotes hepatic cholesterol and triglyceride accretion, a deficit in liver insulin signaling and a reduction in whole-body insulin sensitivity in a background of an unhealthy, Western-style diet. These effects were observed despite

total calorie intake remaining exactly the same between nonsupplemented and supplemented animals.

Increased energy intake without a corresponding increase in calorie expenditure by physical activity, thermoregulation, etc., leads to an energy imbalance that results in increased body weight, mainly through an expansion of visceral adipose tissue [27]. Thus, in our present work, mice consuming a high-energy-density diet, such as the Western-type diet we used, increased their energy intake by  $\times 1.27$  when compared to control animals, consequently increasing their body weight mainly through a marked accretion of visceral adipose tissue (Table 2). Although Western-diet-fed mice were hyperleptinemic, they did not compensate for the excess of calories ingested by reducing the total amount of solid food consumed, thereby indicating a state of leptin resistance. Indeed, we provide evidence for leptin resistance in the peripheral tissues of Western-diet-fed animals (Fig. 1). Hypertriglyceridemia has been proposed to be key in reducing leptin penetration in the central nervous system and thus inducing central leptin resistance [28]. Given that Western-diet-fed mice showed marked hypertriglyceridemia (Fig. 2), this could be responsible for the lack of calorie compensation. This is in accordance with the fact that, although mice supplemented with liquid fructose showed hyperleptinemia and manifestations of peripheral leptin resistance (Fig. 1), they

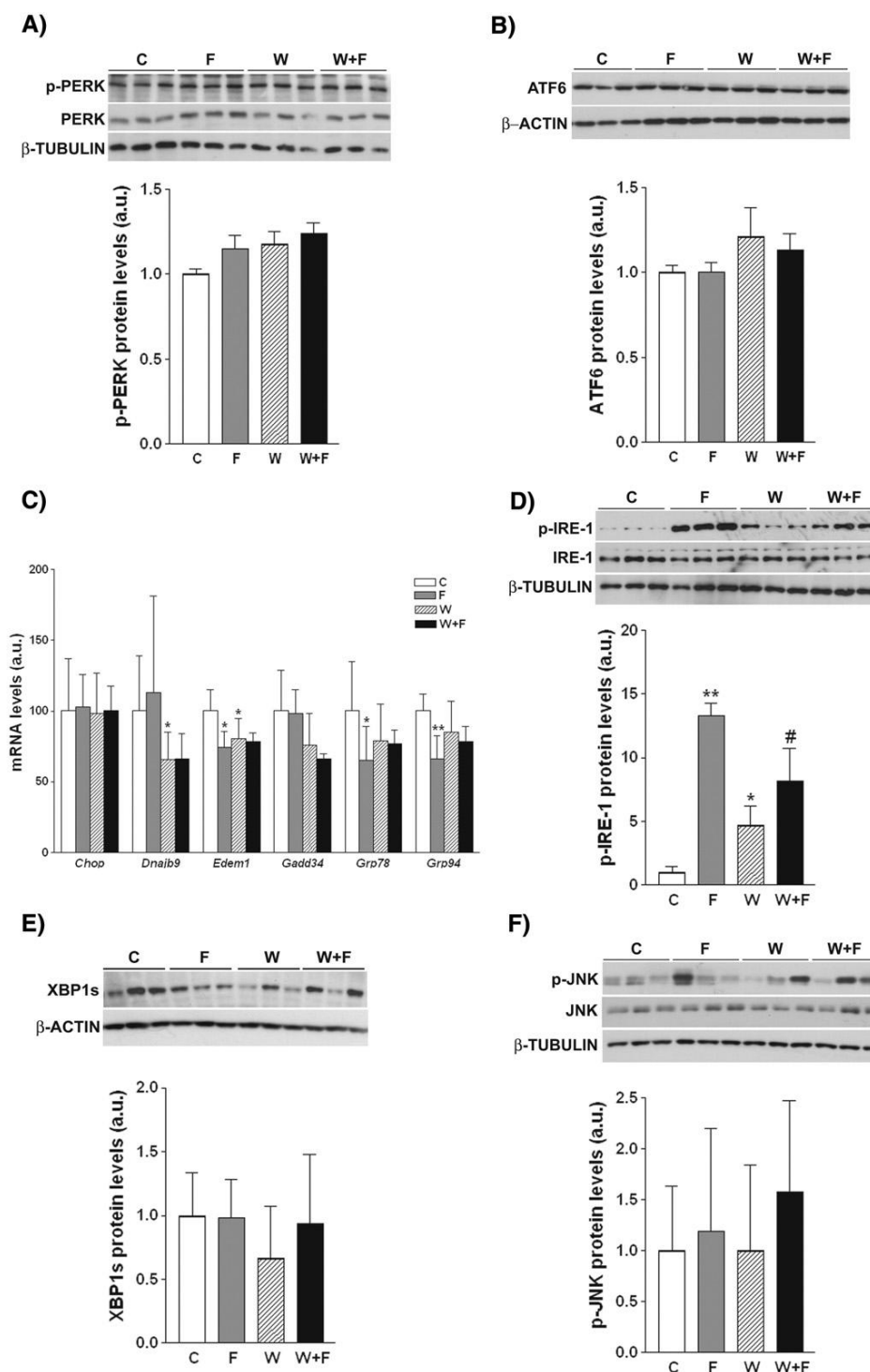


Fig. 5. Western blot of phospho- and total PERK (A) and ATF6 (B) proteins in liver samples obtained from C, F, W and W+F mice. Representative bands corresponding to three different mice in each group are shown; bar plots show the level of the protein expressed as the mean (a.u.) $\pm$ SD of the values obtained from three to four animals. (C) Bar plots showing the relative levels of specific mRNAs from the four experimental groups of mice (mean $\pm$ SD of four to six different liver samples). Western blot of phospho- and total IRE-1 (D), XBP1s (E) and phospho- and total JNK (F) in liver samples obtained from C, F, W and W+F groups. Representative bands corresponding to three different mice in each group are shown; bar plots show the level of the protein expressed as the mean $\pm$ SD of the values obtained from three to four animals. \* $P$ <.05, \*\* $P$ <.01 vs. C values; # $P$ <.05 vs. W values.

did not present hypertriglyceridemia, and consequently, they did compensate for the increased amount of fructose-derived calories by reducing the quantity of solid food consumed. Thus, body weight and the amount of visceral adipose tissue did not change in liquid-

fructose-supplemented mice with respect to their corresponding controls (Table 2).

The lack of hypertriglyceridemia and liver steatosis in fructose-supplemented mice was rather surprising given the wealth of

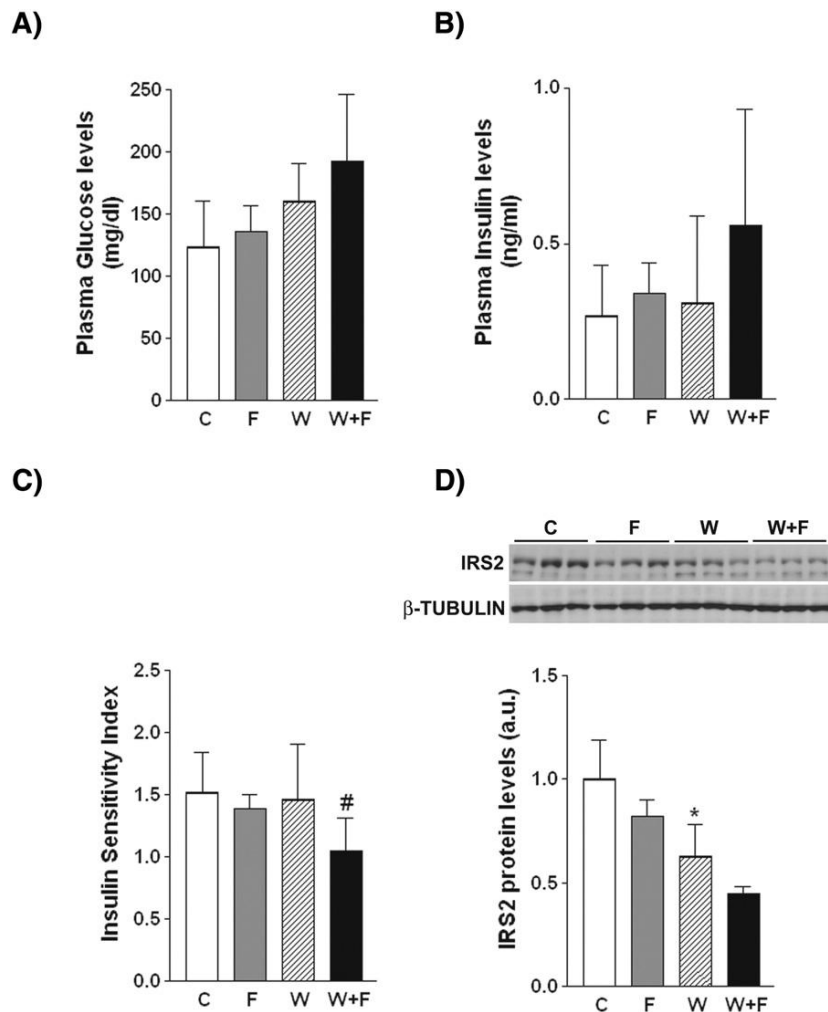


Fig. 6. Glucose (A) and insulin (B) plasmatic levels and ISI (C) from C, F, W and W+F mice (expressed as mean  $\pm$ SD of 6–12 different samples). (D) Western blot of IRS2 protein in liver samples obtained from C, F, W and W+F groups. Representative bands corresponding to three different mice in each group are shown; bar plot shows the level of the protein expressed as the mean (a.u.)  $\pm$ SD of the values obtained from three to four animals. \* $P$ <.05; # $P$ <.05 vs. W values.

information on fructose and increased liver lipogenesis [20] and our previous study with 10% w/v liquid-fructose-supplemented rats [19]. We have previously shown in rats that fructose is more lipogenic than glucose because the former not only directly increases liver lipogenesis but also reduces liver fatty acid  $\beta$ -oxidation activity [6,7]. As mice, unlike rats and humans, are able to transform a considerable amount of fructose into glucose in the intestinal tract [29], one possible explanation for our present results is that the total amount of fructose reaching the liver was not enough to stimulate lipogenesis and also reduce fatty acid oxidation. In fact, when a higher fructose solution is used (30% w/v, see work from the Bergheim group [9]), a clear lipogenic effect is observed in mice but at the expense of changing intestinal permeability that allows the presence of bacterial endotoxins in portal blood and the development of liver TLR4-mediated inflammation [8]. In our mice, fructose supplementation did not increase the expression of inflammatory markers in liver, including endotoxin-related markers such as *tlr4* and *myd88*. An increase in inflammatory markers not related to bacterial endotoxins was only detected in visceral adipose tissue from Western-diet-fed mice. Similarly to our previous observations in rat [23], fructose supple-

mentation did not induce an ERS response. Only the IRE-1 pathway seemed to be activated; however, there were no discernible changes in the downstream targets of IRE-1, either as a kinase, leading to the activation of JNK, or as RNA splicing enzyme, leading to XBP1s' increased expression and transcriptional activity. The consumption of a solid Western diet had a similar, but small, effect on IRE-1 activation as fructose supplementation in the mice. Again, like our previous results in rats [23], we observed increased mTORC1 phosphorylation in the livers of fructose-supplemented mice. mTORC1 activation has been linked to specific stimulation of the IRE-1 pathway [30], possibly explaining the specific and intense increase in IRE-1 phosphorylation observed in fructose-supplemented mice. It is interesting to note that IRE-1 activation has been directly linked to the prevention of hepatic steatosis [31]. In this sense, the strong increase in IRE-1 phosphorylation in fructose-supplemented mouse livers could explain the absence of a lipogenic response in these animals.

Despite the lack of a lipogenic effect, fructose supplementation clearly increased liver triglyceride and cholesterol deposition in mice consuming a solid Western diet, although these animals did reduce their consumption of the solid diet and maintained an isocaloric intake

compared to nonsupplemented Western-diet-fed animals. This effect of fructose supplementation was probably due to the potentiation in the increase of *ppary* and *cd36* expression in the livers of W+F animals. CD36 contributes to the development of fatty liver in mice fed high-fat diets, and ablation of its expression in liver attenuates fat deposition [32]. mTORC1 activation seems to be directly associated with this potentiating effect of fructose on *cd36* expression and liver cholesterol accretion in the livers of Western-diet-fed mice. Indeed, mTORC1 has been linked to an increased expression of cholesterol biosynthetic [33] and *cd36* [34,35] genes. The combined effects of the Western diet and fructose supplementation, especially on *cd36* expression, resulted in the largest liver lipid deposition in the studied animals. We had previously observed a similar effect of fructose supplementation in LDL-R<sup>-/-</sup> mice, although these transgenic animals already presented a large fat deposition in the liver even when raised with standard rodent chow [10].

The strong induction of *cd36* in W+F mice could also be linked to the impaired liver insulin signaling and reduced whole-body insulin sensitivity in these animals. Fructose supplementation reduced liver IRS2 expression probably through an mTORC1-related mechanism, as previously reported in rats [24,25]. Liver *cd36* expression correlates with reduced whole-body insulin sensitivity, and its liver ablation restores and improves insulin sensitivity [32]. Thus, the combined effects of liquid fructose supplementation and Western diet consumption are sufficient to clearly impair not only liver but also whole-body insulin sensitivity in mice, even with unchanged calorie intake.

In conclusion, through a mechanism that probably involves liver mTORC1 activation, liquid fructose supplementation in metabolically unfit mice consuming a Western diet potentiates liver cholesterol and triglyceride deposition, impairs liver insulin signaling and reduces whole-body insulin sensitivity, without increasing total calorie intake and thus visceral adipose tissue deposition and body weight. Whether metabolic disease of polygenic origin (such as human obesity or insulin resistance) confers a high susceptibility to fructose-related metabolic derangement deserves further research.

#### Funding sources

This work was supported by grants from the Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, the Ministry of Economy and Competition (SAF2013-42982-R) and European Commission FEDER funds. Miguel Baena and Gemma Sangüesa were supported by FPI and FPU grants, respectively, from the Spanish Ministry of Science and Innovation. We are a Consolidated Research Group of the Autonomous Government of Catalonia (SGR13-00066).

#### Conflict of interest

No potential conflict of interest, including related consultancies, shareholdings and funding grants, exists for any of the authors of the present work.

#### Acknowledgments

We would like to thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for revising the manuscript.

#### References

[1] The InterAct consortium. Consumption of sweet beverages and type 2 diabetes incidence in European adults: results from EPIC-InterAct; 2013. *Diabetologia* 56: 1520–30. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-013-2899-8>.  
 [2] Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després J-P, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk; 2010.

*Circulation* 121:1356–64. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.876185>.  
 [3] Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans; 2009. *J Clin Invest* 119:1322–34. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI37385DS1>.  
 [4] Ebbeling CB, Feldman HA, Chomitz VR, Antonelli TA, Gortmaker SL, Osganian SK, et al. A randomized trial of sugar-sweetened beverages and adolescent body weight; 2012. *N Engl J Med* 367:1407–16. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1203388>.  
 [5] Lê KA, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, et al. A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2006;84:1374–9.  
 [6] Roglans N, Vilà L, Farré M, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, et al. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats; 2007. *Hepatology* 45:778–88. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21499>.  
 [7] Rebollo A, Roglans N, Baena M, Sánchez RM, Merlos M. Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1841;2014:514–24.  
 [8] Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 2009;50:1094–104.  
 [9] Bergheim I, Weber S, Vos M, Krämer S, Volynets V, Kaserouni S, et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin; 2008. *J Hepatol* 48:983–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2008.01.035>.  
 [10] Hutter N, Baena M, Sangüesa G, Dávalos A, Latasa MJ, Escolá-Gil JC, et al. Liquid fructose supplementation in LDL-R<sup>-/-</sup> mice fed a Western-type diet enhances lipid burden and atherosclerosis despite identical calorie consumption; 2015. *IJC Metabolic Endocrine* 9:12–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcme.2015.10.002>.  
 [11] Helenius M, Hänninen M, Lehtinen S, Salminen A. Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF-κB transcription factor in mouse cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:487–98.  
 [12] Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.  
 [13] Qu S, Su D, Altomonte J, Kamagata A, He J, Perdomo G, et al. PPAR{alpha} mediates the hypolipidemic action of fibrates by antagonizing FoxO1; 2007. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E421–34. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00157.2006>.  
 [14] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911–7.  
 [15] Lazarow P. Assay of peroxisomal beta-oxidation of fatty acids. *Methods Enzymol* 1981;72:315–9.  
 [16] Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins; 2006. *Trends Endocrinol Metab* 17:365–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2006.09.007>.  
 [17] Cohen P, Yang G, Yu X, Soukas AA, Wolfish CS, Friedman JM, et al. Induction of leptin receptor expression in the liver by leptin and food deprivation; 2005. *J Biol Chem* 280:10034–9. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M413684200>.  
 [18] Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism; 2005. *Nutr Rev* 63:133–57. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2005.tb00132.x>.  
 [19] Rebollo A, Roglans N, Alegret M, Laguna JC. Way back for fructose and liver metabolism: bench side to molecular insights; 2012. *World J Gastroenterol* 18: 6552–9. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v18.i45.6552>.  
 [20] Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease; 2008. *J Hepatol* 48:993–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2008.02.011>.  
 [21] Vilà L, Rebollo A, Adalsteisson GS, Alegret M, Merlos M, Roglans N, et al. Reduction of liver fructokinase expression and improved hepatic inflammation and metabolism in liquid fructose-fed rats after atorvastatin treatment; 2011. *Toxicol Appl Pharmacol* 251:32–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2010.11.011>.  
 [22] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); 2009. *Prog Lipid Res* 48:1–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2008.08.001>.  
 [23] Baena M, Sangüesa G, Hutter N, Sánchez RM, Roglans N, Laguna JC, et al. Fructose supplementation impairs rat liver autophagy through mTORC activation without inducing endoplasmic reticulum stress; 1851. *Biochim Biophys Acta* 2015: 107–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.11.003>.  
 [24] Vilà L, Roglans N, Perna V, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Alegret M, et al. Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose; 2011. *J Nutr Biochem* 22:741–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.06.005>.  
 [25] Rebollo A, Roglans N, Baena M, Padrosa A, Sánchez RM, Merlos M, et al. Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats; 2014. *J Nutr Biochem* 25: 250–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.014>.  
 [26] Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, et al. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 2000;49:1880–9.  
 [27] Tchernof A, Despres J-P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update; 2013. *Physiol Rev* 93:359–404. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00033.2011>.  
 [28] Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoka R, et al. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier; 2004. *Diabetes* 53:1253–60. <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.53.5.1253>.

- [29] Mayes P. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr* 1993;58:754S–65S.
- [30] Kato H, Nakajima S, Saito Y, Takahashi S, Katoh R, Kitamura M. mTORC1 serves ER stress-triggered apoptosis via selective activation of the IRE1–JNK pathway; 2012. *Cell Death Differ* 19:310–20. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2011.98>.
- [31] Zhang K, Wang S, Malhotra J, Hassler JR, Back SH, Wang G, et al. The unfolded protein response transducer IRE1alpha prevents ER stress-induced hepatic steatosis; 2011. *Embo J* 30:1357–75. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.52> [emboj201152 [pii]].
- [32] Wilson C, Tran J, Erion D, Vera N, Febbraio M, Weiss E. Hepatocyte-specific disruption of CD36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD fed mice. *Endocrinology* 2015.
- [33] Wang BT, Ducker GS, Barczak AJ, Barbeau R, Erle DJ, Shokat KM. The mammalian target of rapamycin regulates cholesterol biosynthetic gene expression and exhibits a rapamycin-resistant transcriptional profile; 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15201–6. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1103746108>.
- [34] Wang C, Yan Y, Hu L, Zhao L, Yang P, Moorhead JF, et al. Rapamycin-mediated CD36 translational suppression contributes to alleviation of hepatic steatosis; 2014. *Biochem Biophys Res Commun* 447:57–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.103>.
- [35] Wang C, Hu L, Zhao L, Yang P, Moorhead JF, Varghese Z, et al. Inflammatory stress increases hepatic CD36 translational efficiency via activation of the mTOR signalling pathway; 2014. *PLoS One* 9:1–12. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103071>.





# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the three major insulin-sensitive tissues

Miguel Baena<sup>1,2,\*</sup>, Gemma Sangüesa<sup>1,2,\*</sup>, Alberto Dávalos<sup>3</sup>, María-Jesús Latasa<sup>3</sup>, Aleix Sala-Vila<sup>4,5</sup>, Rosa María Sánchez<sup>1,2,4</sup>, Núria Roglans<sup>1,2,4</sup>, Juan Carlos Laguna<sup>1,2,4</sup> & Marta Alegret<sup>1,2,4</sup>

Received: 11 November 2015

Accepted: 27 April 2016

Published: 19 May 2016

Human studies support the relationship between high intake of fructose-sweetened beverages and type 2 diabetes, but there is a debate on whether this effect is fructose-specific or it is merely associated to an excessive caloric intake. Here we investigate the effects of 2 months' supplementation to female rats of equicaloric 10% w/v fructose or glucose solutions on insulin sensitivity in target tissues. Fructose supplementation caused hepatic deposition of triglycerides and changed the fatty acid profile of this fraction, with an increase in monounsaturated and a decrease in polyunsaturated species, but did not cause inflammation and oxidative stress. Fructose but not glucose-supplemented rats displayed an abnormal glucose tolerance test, and did not show increased phosphorylation of V-akt murine thymoma viral oncogene homolog-2 (Akt) in white adipose tissue and liver after insulin administration. In skeletal muscle, phosphorylation of Akt and of Akt substrate of 160 kDa (AS160) was not impaired but the expression of the glucose transporter type 4 (GLUT4) in the plasma membrane was reduced only in fructose-fed rats. In conclusion, fructose but not glucose supplementation causes fatty liver without inflammation and oxidative stress and impairs insulin signaling in the three major insulin-responsive tissues independently from the increase in energy intake.

The incidence of type 2 diabetes and insulin resistance is increasing worldwide, a trend that is largely attributable to lifestyle choices<sup>1</sup>. Unhealthy nutritional patterns such as high consumption of simple carbohydrates are related to these metabolic disorders. The use of fructose as a sweetener in beverages and processed foods (either as high fructose corn syrup or sucrose) contributes to an excessive dietary carbohydrate consumption. Studies in humans show that top consumers ingest over 100 g/day of fructose as added sweetener, which based on a 2000 kcal/day diet means that they derive more than 20% of their calories from fructose<sup>2</sup>. Due to its particular metabolic fate, fructose exerts specific effects on lipid and carbohydrate metabolism<sup>3,4</sup>; moreover, fructose in liquid form may be more harmful than in solid form, as the excess energy is not fully compensated by a decrease in food intake<sup>5</sup>. Several studies in humans support the relationship between high intake of fructose and hyperglycaemia, insulin resistance and type 2 diabetes<sup>3,6,7</sup>. However, it has been suggested that fructose is no worse than glucose in causing adverse cardiometabolic effects, even under equicaloric conditions<sup>8</sup>, and that the metabolic alterations observed should be attributed to the excess of energy intake and to changes in body weight<sup>9</sup>.

The rat is a good model to study the effects of fructose on carbohydrate metabolism in humans<sup>4</sup>. Unlike other species, rats and humans lack the intestinal enzyme that converts a substantial part of ingested fructose into glucose, and the administration of fructose-enriched diets to rats induces metabolic alterations that closely resemble the human metabolic syndrome. Thus, although caution is needed when extending results of animal studies to humans, rats are useful models to understand the molecular mechanisms underlying the metabolic derangements caused by high-fructose diets. We have previously shown that the administration of a 10% w/v fructose solution to female rats caused hyperinsulinaemia, glucose intolerance, reduced insulin receptor substrate-2 (IRS-2) hepatic expression, and hepatic steatosis, which we attributed to the induction of carbohydrate response element

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Institute of Biomedicine, University of Barcelona, Spain. <sup>3</sup>IMDEA Food. CEI UAM+CSIC, Madrid, Spain. <sup>4</sup>CIBER Fisiología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain. <sup>5</sup>Lipid Clinic, Endocrinology and Nutrition Service, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. \*These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.C.L. (email: jclagunae@ub.edu) or M.A. (email: alegret@ub.edu)

binding protein (ChREBP)<sup>10,11</sup>. In these studies, fructose was administered for 14 days, which is a short treatment period given that fructose consumption patterns in humans extend over many years.

Therefore, we studied the effects on insulin signaling in target tissues of a 2-month period of fructose supplementation, comparable to 6 human years of daily fructose consumption<sup>12</sup>. We investigated whether there is a dissociation between fatty liver and insulin resistance and inflammation, as reported in mice with ChREBP overexpression<sup>13</sup>. In addition, to distinguish between effects related to increased caloric intake and the specific effects of fructose, we performed a second set of experiments including a group supplemented with liquid glucose under equicaloric conditions.

## Methods

**Animals and diets.** Female Sprague-Dawley rats obtained from Charles River (Barcelona, Spain) were used for all experiments. Rats were maintained under conditions of constant humidity (40–60%) and temperature (20–24°C) with a light/dark cycle of 12 hours. Procedures were conducted following the ‘Principles of laboratory animal care’ (NIH publication no. 85–23, revised 1985) and in accordance with the guidelines established by the University of Barcelona’s Bioethics Committee (Autonomous Government of Catalonia Act 5/1995, July 21). All the experimental procedures involving animals were approved by the Ethical Committee of Animal Experimentation of the University of Barcelona (approval n° 5448).

**Experiment 1.** 20 rats aged 8 weeks were randomly assigned either to a control group (no supplementary sugar, n = 8) or a fructose-supplemented (10% w/v in drinking water) group (n = 12) for 2 months<sup>14</sup>. At the end of intervention, after a 2-h fast, the animals were anaesthetised with isoflurane and blood taken from the hepatic portal vein was collected in endotoxin-free tubes. Then, rats were euthanized by exsanguination and liver samples were collected and stored as described<sup>15</sup>. The gastrocnemius muscle of both legs, and visceral white adipose tissue (vWAT, including retroperitoneal, perirenal and perigonadal adipose tissue) was collected, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until needed.

**Experiment 2.** Another cohort of rats was used to perform a glucose tolerance test (GTT) and to examine their response to the administration of a bolus of insulin. Study duration was the same as above, but the experimental design also included a group supplemented with a glucose solution (n = 10 animals/group). Liquid and food intake were measured every day, caloric consumption was calculated, and the concentration of the glucose solution to be prepared for the next day was calculated in order to match the amount of calories ingested by the fructose group.

The GTT was performed as described<sup>10</sup>, with some modifications. Briefly, after a 6-h fast, the rats were anaesthetized, and following the collection of an unchallenged sample (time 0), a glucose solution of 2 g/kg body weight was administered into the peritoneal cavity. During the test, blood was collected from the tail vein at 15, 30, 60, 90 and 120 min after glucose administration. Glucose measurements were performed using a hand-held glucometer. Plasma insulin levels were measured at baseline, 15 and 120 min post glucose administration by using a rat insulin ELISA kit (Millipore, Billerica, MA). The area under the curve (AUC) values for glucose and insulin concentrations were calculated by the trapezoidal method, using 0 as the baseline.

One week after the GTT 12-h fasted animals were anaesthetised with ketamine:xylazine (90:10 mg/kg body weight) and intraperitoneally injected with 0.15 units of insulin/g body weight (Humulina® Regular, Lilly, Madrid, Spain)<sup>16</sup>. 15 minutes later, blood was obtained from the hepatic portal vein, and samples from liver, gastrocnemius muscle and vWAT were collected as described for experiment 1.

**Blood/plasma lipids and insulin analysis.** Blood triglycerides were measured using an Accutrend® Plus System glucometer (Cobas, Roche Farma, Barcelona, Spain). Plasma cholesterol was determined by Cholesterol CHOD-POD colorimetric test N° 1001091 (Spinreact, Girona, Spain). Non-esterified fatty acids (NEFA) were determined using a plate-based colorimetric enzymatic assay (5620-01) from Bioo Scientific (Austin, TX, USA). Concentrations of insulin in plasma were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay kit (Millipore, Billerica, MA).

**Quantitative determination of alanine aminotransferase (ALT).** To determine ALT activity in plasma samples we used the ALT/GPT Spinreact kit from Spinreact (Girona, Spain), based on the determination of the rate of decrease in NADH concentration, measured photometrically.

**Lipidomic analysis of liver triglyceride fatty acid composition.** Liver lipids were extracted and analysed as described previously<sup>17</sup>. For fatty acid determination, internal standard of C15:0 triglyceride was added to samples of liver homogenates followed by extraction of the total lipid material with chloroform/methanol (2:1 v/v). Triglycerides were isolated by solid-phase extraction as described in Burdge *et al.*<sup>18</sup>. Fatty acid methyl esters were prepared by incubation with acidified methanol and were separated by gas chromatography with an Agilent 7890 Gas Chromatograph HP 6890 equipped with a 30 m × 0.25 μm × 0.25 mm SupraWAX-280 capillary column (Teknokroma, Barcelona, Spain), an autosampler, and flame ionisation detection. Stearoyl-CoA desaturase (SCD1) activity was calculated as the ratio of palmitoleic to palmitic acid concentrations in hepatic triglycerides (C16:1 n-7/C16:0), as this index reflects hepatic SCD1 expression more closely than the ratio oleic to stearic acid<sup>19</sup>.

**Endotoxin assay.** Blood samples from the hepatic portal vein collected in endotoxin-free tubes were heated at 70 °C for 5 minutes. Endotoxin plasma levels were measured using a limulus amoebocyte lysate assay with a concentration range of 0.015–1.2 EU/mL (Charles River, L’Arbresle, France).

**Histological studies.** Necrosis and fibrosis were analyzed in liver sections stained with haematoxylin-eosin and trichromic acid, respectively. Images, acquired with an Olympus BX43 microscope, were interpreted at BioBanc (Banc de tumors-IDIBAPS, Barcelona Spain).

**RNA preparation and analysis.** Total RNA was isolated by using the TrizolR reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were measured spectrophotometrically using the NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). The ratio of absorbances at 260/230 and at 260/280 were used as indicators for RNA purity. RNA integrity was determined by running samples on 1% agarose gels stained with ethidium bromide. RNA quality was checked by the presence of sharp 28S and 18S rRNA bands at a ratio 2:1. Specific mRNAs were assessed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using SYBR green PCR Master Mix, specific primers and the Applied Biosystems One-Step Plus sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As internal control, TATA box binding protein (tbp) was used. Primer sequences and PCR product length are listed in Supplementary Table 1.

**Analysis of microRNA.** Total RNA, including small RNAs, was isolated using the miRNeasy minikit (Qiagen). For microRNA (miRNA) expression quantification, miRNAs were reverse-transcribed using the miScript II reverse transcription kit (Qiagen). Specific primers were used for each miRNA (Qiagen), and real-time PCR was performed using the miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen) on a 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Relative expression was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using RNU6 for normalisation. Only miRNAs validated for the target genes were analysed. Selection of validated miRNAs was assessed using the MirWalk 3<sup>20</sup> and miRTarbase 4<sup>21</sup> databases.

**Preparation of protein extracts.** Total and nuclear protein extracts from liver and muscle were obtained by the Helenius method<sup>22</sup>. Adipose tissue samples were micronized through freezing with liquid nitrogen and grinding with a mortar. For total protein extraction, lysis buffer with proteases, phosphatases and acetylase inhibitors (50 mM Tris-HCl pH = 8, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM Nappi, 1 mM PMSF, 2 µg/mL leupeptin, 2 µg/mL aprotinin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaM, 1 µM TSA) were added to micronized tissue and homogenized for 1.5 h at 4 °C. Then, samples were centrifuged at 15,000 × g for 15 min at 4 °C and supernatant was collected. Protein concentrations were determined by the Bradford method<sup>23</sup>. To detect GLUT4 protein translocation to the plasma membrane, a subcellular fraction enriched with plasma membrane proteins was prepared from rat muscle samples by sequential centrifugation<sup>24</sup>.

**Western blot analysis.** 30 µg of different protein fractions from rat tissues was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were then transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride transfer membranes (Millipore, Billerica, MA, USA), blocked for 1 h at room temperature with 5% non-fat milk solution in 0.1% Tween-20-Tris-buffered saline (TBS), and incubated as described previously<sup>15</sup>. Detection was performed using the ECL chemiluminescence kit for HRP (Amersham GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain). To confirm the uniformity of protein loading, blots were incubated with β-tubulin or β-actin antibodies (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as a control. Primary antibodies for phospho- and total AKT, phospho- and total AS160, phospho-ERK, GLUT4, phospho-PKA and phospho-TSC-2 were supplied by Cell Signaling (Danvers, MA, USA), those for 14-3-3, ChREBP, phospho- and total FoxO1, IRS-1, IRS-2, MKP-3 and phospho-SGK-1 were obtained from Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA), and antibody against phospho-mTOR was from Millipore (Billerica, MA, USA).

**Statistical analysis.** The results are expressed as the mean of n values ± standard deviation. Plasma samples were assayed in duplicate. Gaussian distribution of the data was verified using the Kolmogorov-Smirnov normality test, and significant differences were established by two-tailed unpaired t-test, ANOVA test, or a non-parametric test, as appropriate (GraphPad Prism Software V5). The level of statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ .

## Results

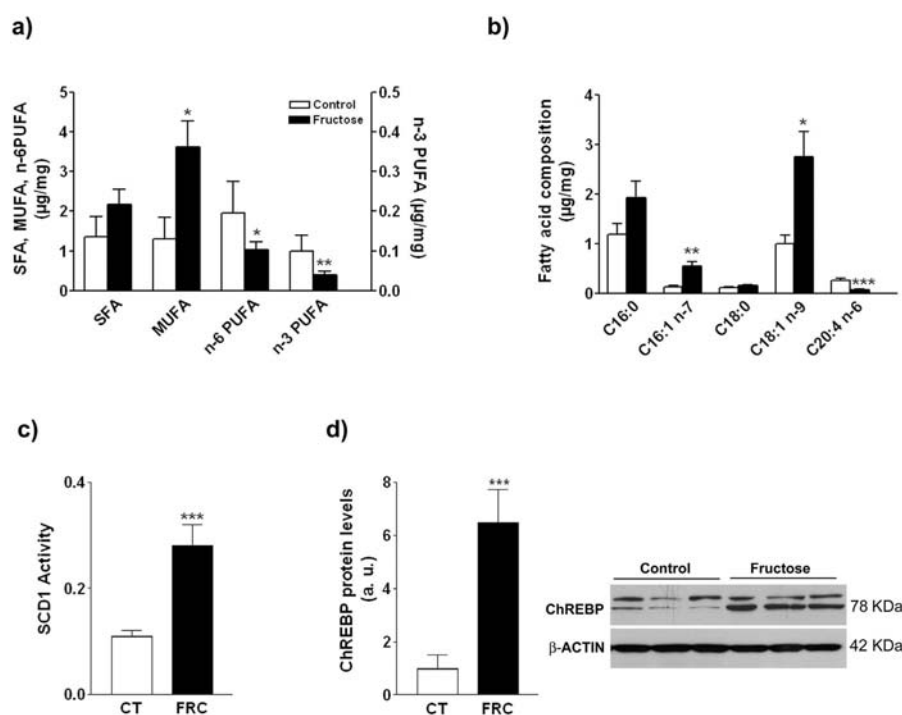
### Fructose induces hepatic steatosis and modifies liver lipid composition through ChREBP induction.

Initially we used liver samples from a previous study<sup>14</sup> to assess the effects of 2 months' 10% (w/v) fructose supplementation on the fatty acid profile of hepatic triglycerides. Fructose supplementation (experiment 1) did not modify plasma cholesterol concentration, but caused hypertriglyceridaemia and hepatic steatosis (Table 1, previous study<sup>14</sup>). Total monounsaturated fatty acids (MUFA) in the hepatic triglyceride fraction were significantly increased (x2.8-fold,  $p < 0.05$ , Fig. 1a), as a result of significant increases in both palmitoleic acid (C16:1 n-7) (x4.1-fold,  $p < 0.01$ ) and oleic acid (C18:1 n-9) (x2.7-fold,  $p < 0.05$ ) (Fig. 1b). Consistently, SCD1 activity estimated by the ratio of product to substrate (C16:1 n-7/C16:0) was increased x2.5-fold ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1c). In contrast, both n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) were decreased x0.4 and x0.5-fold, respectively ( $p < 0.05$ , both) (Fig. 1a). The latter was mostly explained by a x0.3-fold reduction ( $p < 0.001$ ) in arachidonic acid (C20:4 n-6) (Fig. 1b). The amount of ChREBP in nuclear extracts was increased x6.5-fold ( $p < 0.001$ ) compared with control rats (Fig. 1d).

**Fructose reduces hepatic expression of IRS-2.** Fructose supplementation led to a drastic decrease in the amount of hepatic IRS-2 (x0.35-fold,  $p < 0.001$ ) which was not accompanied by a compensatory increase in IRS-1 (Fig. 2a,b). To gain an insight into the mechanisms by which fructose administration leads to reduced IRS-2, we analysed some miRNAs which control the expression of proteins involved in insulin signaling. As shown in

	Control	Fructose
Kcal ingested from solid (2 rats x 2 months) <sup>a</sup>	5604 ± 44	3296 ± 138***
Kcal ingested from liquid (2 rats x 2 months) <sup>a</sup>	0	5825 ± 594
Total ingested kcal (2 rats x 2 months) <sup>a</sup>	5604 ± 44	9121 ± 683***
Plasma insulin (ng/ml)	0.22 ± 0.04	0.42 ± 0.13*
Plasma glucose (mg/dl)	107 ± 14	110 ± 12
Plasma cholesterol (mg/dl)	160 ± 3	164 ± 8
Hepatic triglycerides (mg/mg of protein)	0.011 ± 0.001	0.018 ± 0.005*

**Table 1. Ingested kilocalories, plasma analytes and liver triglycerides of female rats supplemented or not with 10% w/v liquid fructose for 2 months.** AUC: Area Under the Curve. Values are expressed as mean ± SD of 5 controls and 8 fructose-supplemented rats, except for values<sup>a</sup>, which were obtained from 4–6 cages containing 2 rats each. \*p < 0.05; \*\*\*p < 0.001 (unpaired t test).

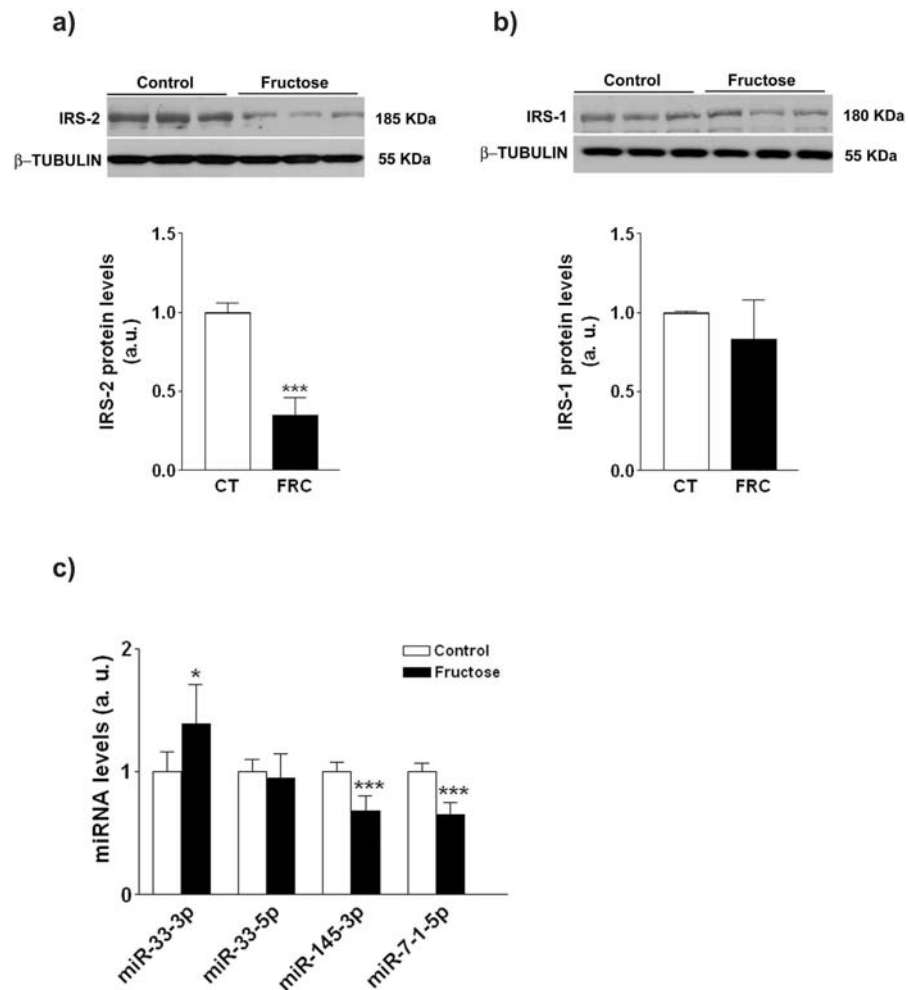


**Figure 1.** Triglyceride fatty acid content (chemical groups (a), selected species (b), and SCD1 activity index estimated by the ratio 16:1/16:0 (c), and western-blot analysis of ChREBP in nuclear extracts (d) in hepatic samples from control and fructose-supplemented rats from experiment 1. Bars represent the mean ± sd of values obtained from n = 6 (control) and n = 8 (fructose-fed) animals. A representative western blot corresponding to 3 different control and fructose-fed rats is shown. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 (unpaired t test).

Fig. 2c, miR-33-3p expression was increased (x1.4-fold, p < 0.05), whereas the expression of miR-145-3p and 7-1-5p was reduced (x0.65-0.68-fold, p < 0.0001).

**Hepatic steatosis in fructose-supplemented rats is dissociated from inflammation and oxidative stress in liver and vWAT.** The livers of fructose-supplemented rats showed a reduced mRNA level (x0.45-fold, p = 0.05) of nuclear factor-E2-related factor-2 (*nrf2*), a cellular sensor for oxidative stress (Table 2). Expression of the antioxidant genes glutathione peroxidase 1 (*gpx1*) and superoxide dismutase 2 (*sod2*) was not significantly altered (Table 2).

Endotoxin levels in portal vein blood samples, and hepatic mRNA expression of toll-like receptor-4 (*tlr4*) and its downstream myeloid differentiation factor 88 (*myd88*), were unaffected by fructose supplementation. Accordingly, there was no activation of nuclear factor κB (NFκB), exemplified by unchanged expression of IκB and p65 proteins in nuclear extracts (Table 2). Other markers of liver tissue inflammation remained unaltered, mRNA levels of metallothionein-1 and -2 (*mt-1* and *mt-2*) were even reduced, and plasma ALT levels were decreased as well in fructose-supplemented versus control rats, confirming the lack of hepatic inflammation



**Figure 2.** Expression of proteins and microRNAs involved in hepatic insulin signaling. IRS-2 (a) and IRS-1 (b) protein levels determined by western blot. (c) RT-PCR analysis of miR-33-3p, miR-33-5p, miR-145-3p and miR-7-1-5p. Bars represent the mean  $\pm$  sd of values obtained from n = 6 (control) and n = 8 (fructose-fed) animals from experiment 1. Representative western blots corresponding to 3 different control and fructose-fed rats are shown. \*p < 0.05; \*\*\*p < 0.001 (unpaired t test).

(Table 2). In addition, we did not detect any histological signs of hepatic necrosis or fibrosis (Fig. 3) and mRNA expression of collagenase-1 (*collα1*), a gene involved in liver fibrogenesis, was not significantly altered (Table 2). Similarly, markers of inflammation and fibrosis in vWAT from fructose-supplemented rats were not modified (Table 2).

**Fructose but not glucose supplementation causes an abnormal GTT.** We used a second cohort of rats to perform a GTT, where we included an additional group of animals supplemented with a glucose solution adjusted to match the amount of calories provided by fructose (experiment 2). As shown in Table 3, both glucose- and fructose-supplemented groups behaved similarly regarding food and drink consumption: they drank approximately x4-fold more than control rats (p < 0.001), and reduced their solid food consumption x0.6-fold (p < 0.0001). Consequently, the total caloric intake in both groups was almost identical and x1.6-fold higher (p < 0.001) than in control rats. Despite this, body weight and vWAT weight at the end of treatment were not significantly different in the three groups. Plasma triglyceride concentrations were significantly increased (p < 0.01) in sugar-supplemented rats. Plasma insulin levels were also increased (p < 0.05 for fructose-fed rats), whereas glucose concentrations were not changed.

The results of the GTT showed that only fructose-supplemented rats displayed increased blood glucose excursions at all time-points after the glucose challenge (Fig. 4a); consequently, the integrated glucose concentration calculated as the area under the curve (AUC) was increased x1.3-fold in fructose- (p < 0.05 vs control) but not in glucose-supplemented rats (Fig. 4b). However, glucose-stimulated insulin levels were significantly increased in both fructose- and glucose-supplemented rats (Fig. 4c,d).

				Control	Fructose
Oxidative stress	Liver	mRNA	<i>nrf2</i>	100 ± 39	55 ± 28*
			<i>gpx1</i>	100 ± 3	93 ± 11
			<i>sod2</i>	100 ± 10	108 ± 9
Inflammation	Liver	mRNA	<i>tlr4</i>	100 ± 14	84 ± 11
			<i>myd88</i>	100 ± 7	84 ± 8
			<i>tnfα</i>	100 ± 57	115 ± 59
			<i>nlrp3</i>	100 ± 55	108 ± 54
			<i>mcp-1</i>	100 ± 17	106 ± 19
			<i>pai-1</i>	100 ± 10	95 ± 19
			<i>mt-1</i>	100 ± 19	40 ± 21***
			<i>mt-2</i>	100 ± 40	32 ± 17*
			protein		
			IκBα	1.00 ± 0.07	0.96 ± 0.06
			p65	1.00 ± 0.09	0.97 ± 0.18
	VWAT	mRNA	<i>tlr4</i>	100 ± 51	100 ± 41
			<i>myd88</i>	100 ± 49	96 ± 21
			<i>tnfα</i>	100 ± 88	92 ± 74
			<i>mcp-1</i>	100 ± 38	131 ± 68
	Plasma	Endotoxin (EU/ml)		29.1 ± 28.5	20.1 ± 12.8
		ALT (U/l)		25.7 ± 7.5	18.1 ± 4.2*
Fibrosis	Liver	mRNA	<i>collα1</i>	100 ± 64	119 ± 74
	vWAT	mRNA	<i>collα1</i>	100 ± 51	68 ± 76

**Table 2. Effects of 10% w/v fructose supplementation for 2 months on markers of oxidative stress, inflammation and fibrosis.** Values are expressed as mean ± SD of 5 controls and 8 fructose-supplemented rats. *Collα1*: collagenase 1, *gpx1*: glutathione peroxidase 1, IκBα: nuclear factor κ-B inhibitor α, *mcp-1*: monocyte chemoattractant protein-1, *mt*: metallothionein, *myd88*: myeloid differentiation factor 88, *nlrp3*: pyrin domain containing 3 gene, *nrf2*: nuclear factor-E2-related factor-2, *pai-1*: plasminogen activator inhibitor-1, *tlr*: toll-like receptor, *sod2*: superoxide dismutase 2, *tnfα*: tumor necrosis factor α. EU: endotoxin units. U: international units \*p < 0.05; \*\*\*p < 0.001 (unpaired t test).

### Increased phosphorylation of forkhead box protein O1 (FoxO1) impairs gluconeogenic gene induction even though insulin-induced Akt phosphorylation is hampered in the liver of fructose-supplemented rats.

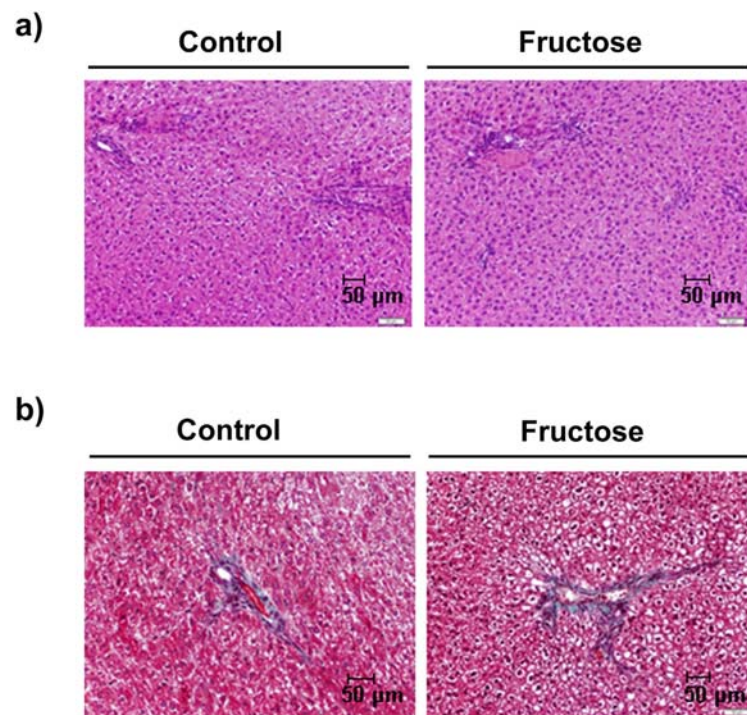
Fructose-, but not glucose-supplemented rats, exhibited reduced levels of hepatic IRS-2 (x0.59-fold, p < 0.05) (Fig. 5a), whereas IRS-1 expression was not significantly modified by sugar supplementation (Fig. 5b). The abnormal GTT and reduced IRS-2 expression in the liver of fructose-supplemented rats pointed to an impairment in hepatic insulin signaling. Despite the hyperinsulinaemia present in both carbohydrate-supplemented groups (Table 3), phosphorylation of Akt in the liver was not modified (Fig. 5c). However, there was a marked increase in the phosphorylated form of FoxO1 in the livers of fructose- (x2.3-fold, p < 0.05) and glucose-supplemented (x2.7-fold, p < 0.05) rats (Fig. 5d). The expression of major gluconeogenic genes was either unchanged (phosphoenolpyruvate carboxykinase, *pepck*; Fig. 5e) or even reduced (glucose-6-phosphatase, *g6pc*; Fig. 5f).

Possible explanations for increased levels of p-FoxO1 independently from Akt phosphorylation status could include changes in the expression or activity of other kinases or phosphatases, but none of them were significantly affected by carbohydrate supplementation (Fig. 6a–d). Recently, it has been described that FoxO1 phosphorylation is controlled by the mammalian target of rapamycin (mTOR) in rat hypothalamus<sup>25</sup> and in human smooth muscle cells<sup>26</sup>. As shown in Fig. 6e,f, hepatic samples from both fructose- and glucose-supplemented rats showed an increase in Ser-2481 mTOR and in Thr-1462 tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) phosphorylation, indicative of mTOR activation.

To further explore hepatic insulin sensitivity, Akt activation was measured in the liver of control and carbohydrate-supplemented rats 15 minutes after a single injection of saline or insulin (0.15 units/g body weight). Akt phosphorylation was increased x2.3-fold and x1.7-fold (p < 0.05) in the liver of insulin-treated rats from control and glucose groups compared with saline-treated animals, but not in fructose-supplemented rats (Fig. 7a).

### Fructose but not glucose supplementation impairs insulin signaling in vWAT.

Under basal conditions the expression of key enzymes involved in triglyceride synthesis was only significantly increased in vWAT of glucose-supplemented rats (Fig. 8a–c), even though insulin promotes lipogenesis in adipose tissue and both carbohydrate-supplemented groups showed hyperinsulinaemia. On the other hand, sugar supplementation did not promote inflammation in vWAT, as shown by no significant changes in mRNA levels of *mcp-1* and *tnfα* (Fig. 8d,e). When we compared Akt phosphorylation in vWAT after administration of the insulin bolus (Fig. 7b), we observed a striking increase in control rats (x8.9-fold, p < 0.05), a significant but less marked increase in glucose-supplemented rats (x1.9-fold, p < 0.05) and no change in fructose-supplemented rats. As the main effect of insulin on adipose tissue is lipolysis inhibition, we determined plasma NEFA levels after insulin administration.



**Figure 3.** Histological study of liver sections from control and fructose-supplemented rats stained with H&E (a) and Masson's trichrome (b). Images are representative from  $n = 4$ /group, experiment 1 (magnification 20X).

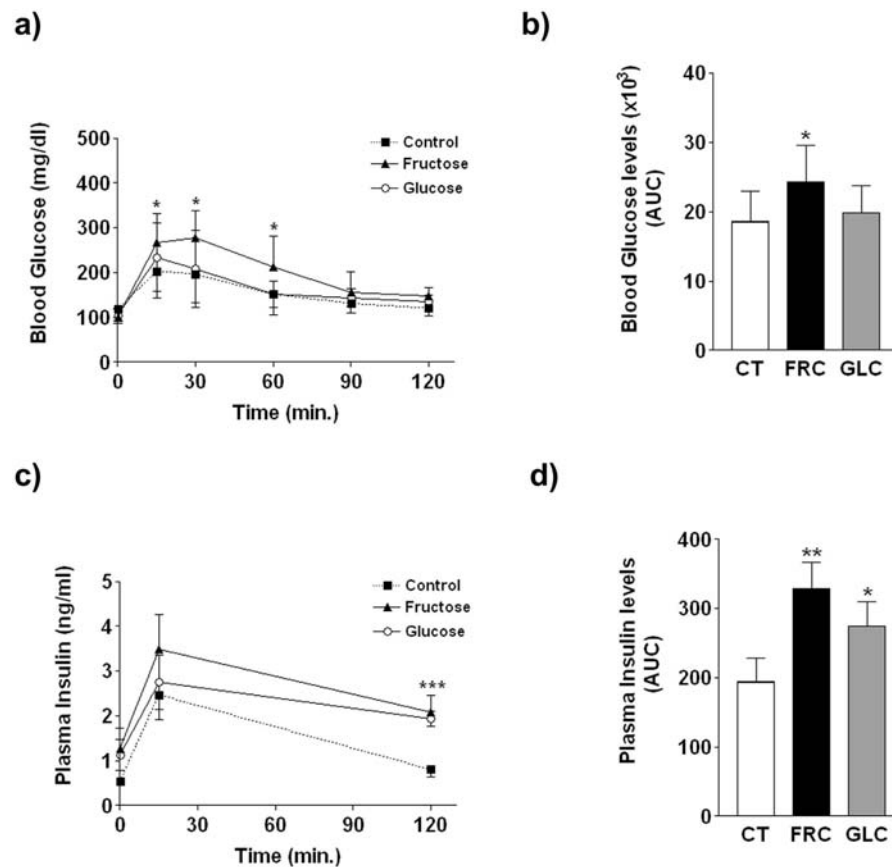
	Control	Fructose	Glucose
AUC solid food intake (g/[2 rats x 2 months]) <sup>a</sup>	1553 ± 79	930 ± 124***	904 ± 100***
AUC liquid intake (ml/[2 rats x 2 months]) <sup>a</sup>	2893 ± 711	11448 ± 2713***	12163 ± 701***
Kcal ingested from solid (2 rats x 2 months) <sup>a</sup>	4502 ± 229	2698 ± 359***	2624 ± 289***
Kcal ingested from liquid (2 rats x 2 months) <sup>a</sup>	0	4579 ± 1085	4850 ± 280
Total ingested kcal (2 rats x 2 months) <sup>a</sup>	4502 ± 229	7277 ± 735***	7489 ± 354***
Final body weight (g)	253.2 ± 14.9	261.8 ± 12.3	265.3 ± 16.1
AUC weight (g/[2 rats x 2 months]) <sup>a</sup>	13188 ± 721	13479 ± 534	13594 ± 645
vWAT weight (g)	5.6 ± 1.4	6.5 ± 1.7	6.8 ± 1.8
Plasma insulin (ng/ml)	0.54 ± 0.02	1.26 ± 0.46*	1.13 ± 0.35
Plasma glucose (mg/dl)	118 ± 25	100 ± 17	104 ± 17
Plasma triglycerides (mg/dl)	128 ± 17	177 ± 40**	159 ± 18**

**Table 3. Zoometric parameters and plasma analytes of female rats supplemented or not with 10% w/v liquid fructose or glucose for 2 months.** AUC: Area Under the Curve. Values are expressed as mean ± SD of 10 controls, 10 glucose and 10 fructose-supplemented rats, except for values<sup>a</sup>, which were obtained from 5 cages containing 2 rats each. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (one-way ANOVA and Bonferroni post-test).

NEFA were reduced in the three experimental groups, although the reduction was of a greater magnitude in control and glucose-supplemented rats (Fig. 8f).

#### Fructose, but not glucose supplementation reduces GLUT4 levels in plasma membrane.

Exogenous insulin administration similarly increased Akt phosphorylation in skeletal muscle from control, glucose- and fructose-supplemented animals (Fig. 7c). AS160 phosphorylation in insulin-treated rats was significantly increased in both fructose and glucose groups (x1.7- and x1.5-fold, respectively,  $p < 0.05$ ), whereas the total amount of AS160 was not significantly modified (Fig. 9a). The amount of the phosphoprotein-binding protein 14-3-3 was not affected by sugar supplementation (Fig. 9b). However, the expression of GLUT4 in a plasma membrane-enriched fraction was reduced in fructose-supplemented rats and increased in the glucose group (Fig. 9c). To further characterize the process of GLUT4 translocation, we assessed the expression of proteins involved in the fusion of GLUT4 containing vesicles to the plasma membrane, but none of them was significantly modified by sugar supplementation (Fig. 9d).



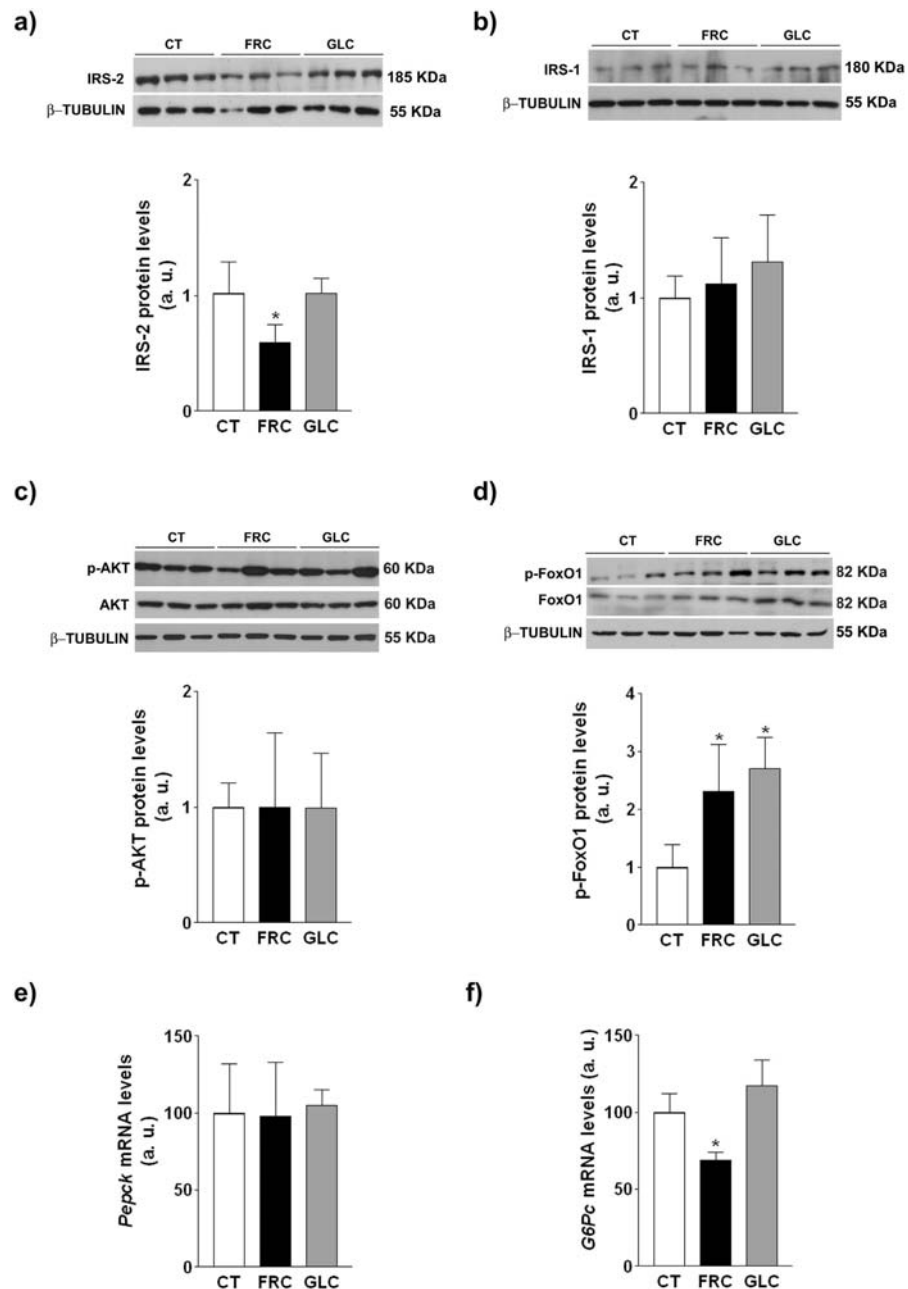
**Figure 4. Results of the glucose tolerance test in rats from experiment 2.** Blood glucose (a) and plasma insulin (c) values at different times after intraperitoneal administration of a glucose solution (2 g/kg body weight). Area under the curve (AUC) values for glucose (b) and insulin (d) concentrations shown in Fig. 1a,c, respectively. Results are the mean  $\pm$  sd of values from 10 animals/group. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (one-way ANOVA and Bonferroni post test).

## Discussion

Here we show that supplementation with 10% w/v liquid fructose for 2 months to female rats causes liver deposition of triglycerides enriched in MUFA with no signs of liver and vWAT inflammation and oxidative stress. Nevertheless, fructose-supplemented rats display an abnormal GTT and an impairment of insulin signaling in the three major insulin-responsive tissues: in vWAT and liver, where fructose inhibits insulin-induced Akt phosphorylation, and in skeletal muscle, where Akt is correctly activated by insulin but GLUT4 expression in the plasma membrane is reduced. These effects are specific to fructose, and not related to the amount of calories ingested, as equicaloric glucose supplementation does not affect tissue-insulin signaling and does not alter the GTT, although at the expense of high plasma insulin levels.

We and others have previously reported fructose-related stimulation of *de novo* lipogenesis and fatty liver in animal models<sup>15,27–30</sup> and in humans<sup>31–33</sup>. In this complex process, the microsomal enzyme SCD1 is rate-limiting in the hepatic synthesis of palmitoleic and oleic acids, the main species contained in liver lipid droplets. However, there is debate on whether expression of SCD1 causally contributes to the disease or is a mere consequence, i.e., to prevent liver damage by partitioning more lipotoxic intermediate products such as free fatty acids, ceramides and diacylglycerols<sup>34,35</sup>. In line with the latter, a recent study in mice overexpressing ChREBP showed that SCD1 induction increases the content of hepatic MUFA while protecting the liver from insulin resistance and hepatic inflammation<sup>13</sup>. Fructose supplementation induces a similar effect in our study: ChREBP is activated (Fig. 1D), SCD1 expression<sup>14</sup> and activity (Fig. 1C) are increased, and there is a change in the pattern of hepatic triglyceride fatty acids consisting in an increase in MUFA (palmitoleic and oleic) and a decrease in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) (Fig. 1A), but no inflammation is ensued (Table 2). The last finding is consistent with a trial in healthy humans, reporting that very-high-fructose or glucose intake for 4 weeks does not cause inflammation<sup>36</sup>. The decrease in PUFA could also explain the lack of oxidative stress in fructose-supplemented rats, as PUFA are more prone to oxidation than MUFA, and n-3 PUFA promote lipid oxidation<sup>37</sup>. In addition, inflammation in fructose-supplemented mice has been shown to result from alterations in the intestinal barrier permeability and increased flux of endotoxins to the liver<sup>38,39</sup>. We did not find increased plasma endotoxin levels or changes

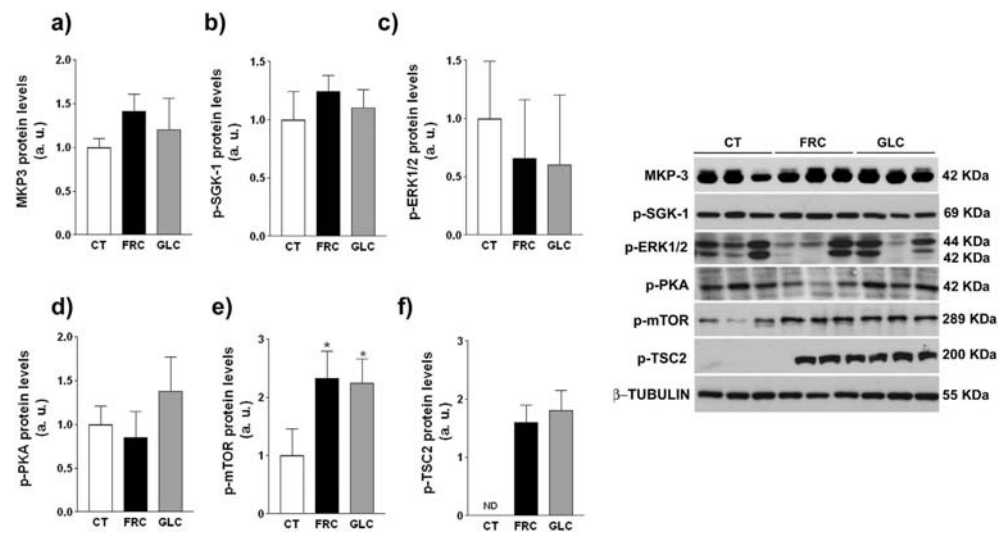




**Figure 5. Insulin signaling in hepatic samples.** Protein expression of (a) IRS-2, (b) IRS-1, (c) phosphorylated and total AKT, and (d) phosphorylated and total FoxO1, and mRNA levels of *pepck* (e) and *g6pc* (f). Bars represent the mean  $\pm$  sd of values obtained from  $n = 4$  rats from experiment 2/group. Representative western blots corresponding to 3 different rats for each condition are shown in Fig. a–c. \* $p < 0.05$  (one-way ANOVA and Bonferroni post test).

in the expression of related receptors and downstream factors in rats, suggesting that this is a species-specific response of mice to fructose supplementation.

Despite the lack of an inflammatory or oxidative response, we nevertheless observe reduced levels of the main hepatic insulin transducer, IRS-2, in the liver of fructose-supplemented rats, thus suggesting liver insulin resistance. Reduced hepatic IRS-2 was also found in our previous 2-week fructose supplementation study, and we attributed this effect to increased mTOR activity<sup>11</sup>. Besides observing that same increment in mTOR activity within this study, we show an increase in miR-33-3p as a new mechanism contributing to fructose reduction of hepatic IRS2 expression<sup>40</sup>. To our knowledge, this is the first report on the modulation of miRNA-33 by fructose



**Figure 6. Expression of phosphatases and kinases related to FoxO1 phosphorylation in hepatic samples.**

Western blot of MKP-3 (a), phospho-SGK-1 (b), phospho-ERK1/2 (c) phospho-PKA (d), phospho-mTOR (e), and phospho-TSC2 (f). Bars represent the mean  $\pm$  sd of values obtained from  $n = 4$  animals from experiment 2. Representative bands corresponding to 3 different rats per treatment group are shown. ERK: extracellular signal-regulated kinase; MKP-3: MAP kinase phosphatase 3; PKA: protein kinase A; SGK-1: serum- and glucocorticoid- inducible kinase 1. \* $p < 0.05$  (one-way ANOVA and Bonferroni post test).

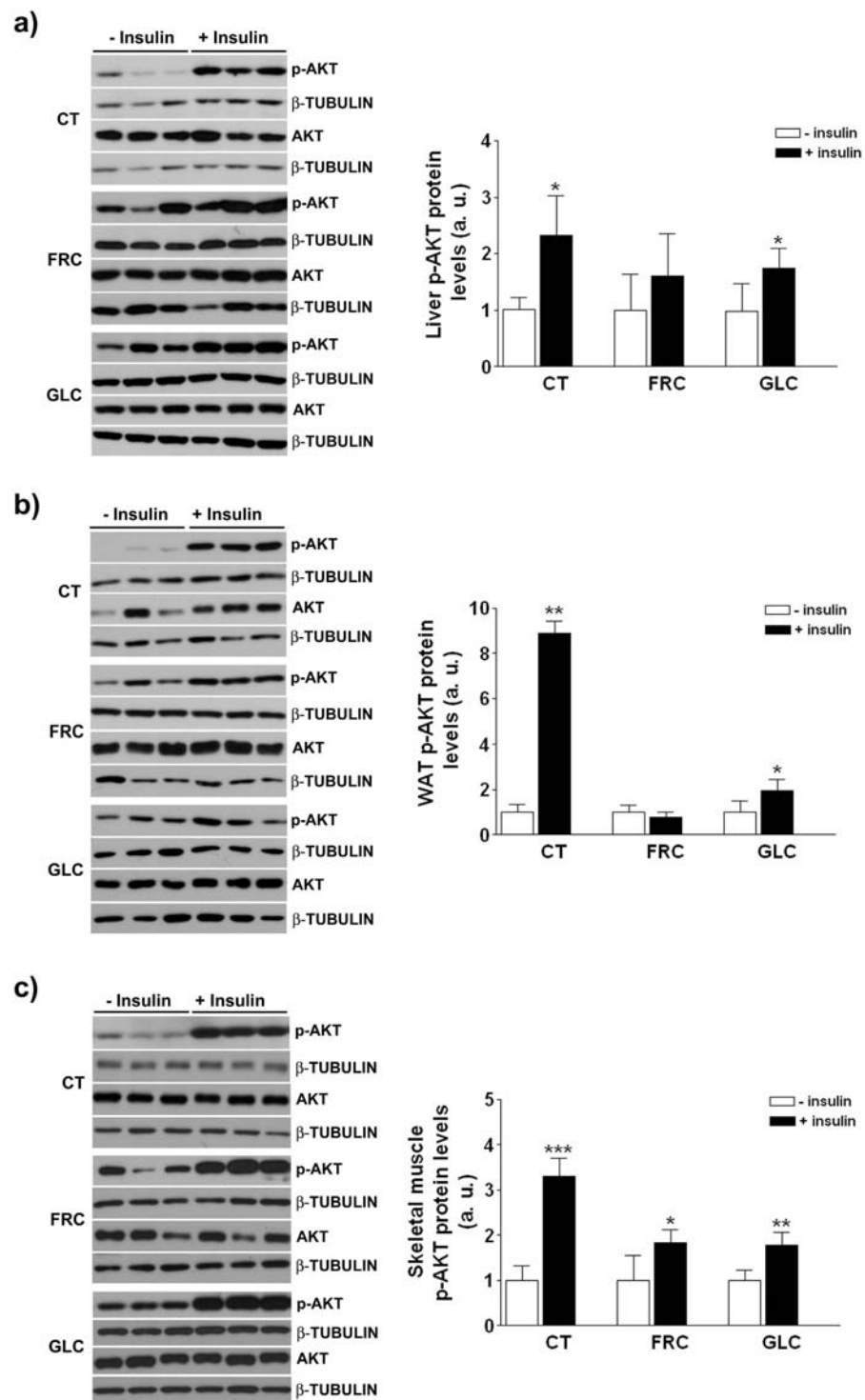
ingestion, although dietary glycaemic load, and specifically diet supplementation with liquid fructose, can alter the miRNA liver expression profile<sup>41,42</sup>.

Under eucaloric conditions (see Table 3), we show that fructose but not glucose supplementation induces glucose intolerance. Both glucose- and fructose-supplemented groups responded to the glucose challenge by increasing plasma insulin levels; however, this hyperinsulinaemia only maintained blood glucose concentrations within the normal range in glucose-supplemented animals, whereas glucose levels throughout the GTT were increased by 30% in fructose-supplemented rats (Fig. 4). This difference between the two carbohydrates prompted us to examine whether insulin signaling is also specifically impaired by fructose in target tissues.

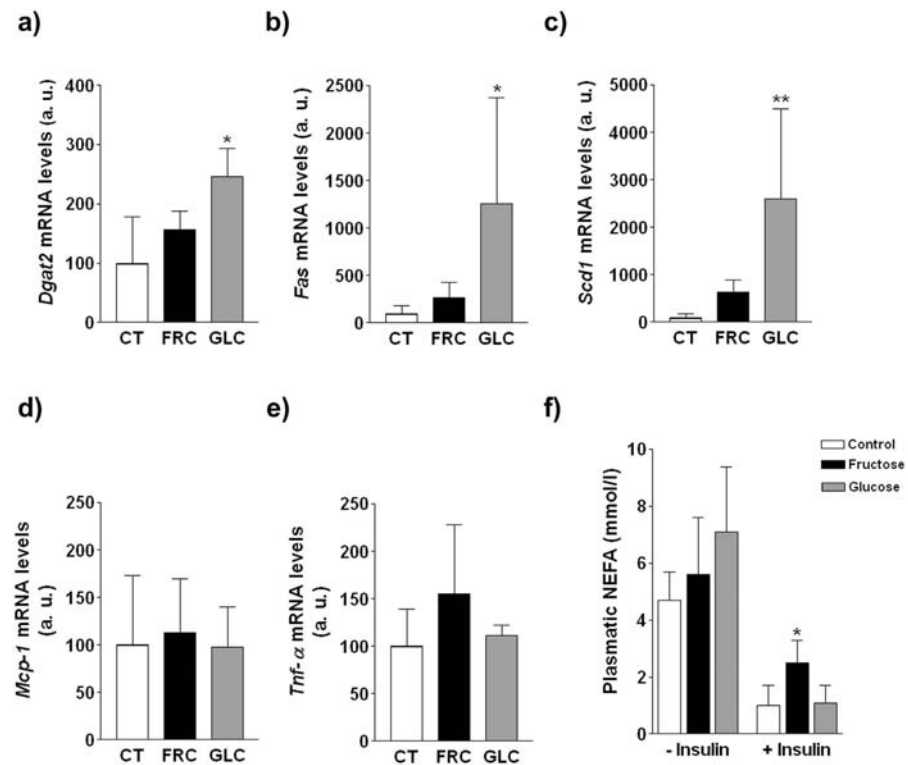
In adipose tissue, insulin signals through Akt to reduce lipolysis and NEFA release to the bloodstream<sup>43,44</sup>. Our results demonstrate that fructose impairs insulin signaling in vWAT: after administration of an insulin bolus, Akt phosphorylation in vWAT is only blunted in fructose-supplemented rats (Fig. 7b). Crescenzo *et al.* reported reduced p-Akt related to plasma insulin in WAT, and impairment in the capacity of insulin to inhibit lipolysis in cultured adipocytes from male rats fed a fructose-rich solid diet<sup>45</sup>. Although we did not directly measure *in vitro* lipolytic activity, plasma NEFA after insulin administration were more efficiently reduced in control and glucose-fed animals than in the fructose group (Fig. 8f).

In the liver, only fructose supplementation reduces IRS-2 protein expression and insulin-induced Akt phosphorylation (Figs 5a and 7a). Nevertheless, this state of fructose-induced insulin resistance is atypical, as FoxO1 phosphorylation is increased (Fig. 5d) and therefore the expression of gluconeogenic genes is not induced (Fig. 5d,e). It should be noted that FoxO1 phosphorylation is increased in both fructose and glucose groups, suggesting that this effect is independent from Akt and related to the high calorie intake of these animals. Nutrient-rich conditions activate mTOR<sup>46</sup>, and we have previously demonstrated that fructose supplementation activates mTOR through increased phosphorylation<sup>14</sup>. We show here that mTOR is activated to the same extent in both carbohydrate-supplemented groups (Fig. 6e), which is attributable to an almost identical excess in nutrient intake (Table 3). As it has recently been shown that activated mTOR inhibits the activity of FoxO1 by increasing its phosphorylation<sup>25,26</sup>, we can conclude that the increase in calorie intake in both carbohydrate-supplemented groups leads to mTOR activation, resulting in similar increases in FoxO1 phosphorylation.

One consequence of this atypical hepatic insulin resistance is that the higher glucose levels observed during the GTT in fructose-supplemented rats cannot be explained by an increase in hepatic glucose production. Reduced glucose uptake by skeletal muscle may be an alternative explanation, as this is the main tissue responsible for glucose disposal<sup>47</sup>. Here, we show that after exogenous insulin administration, Akt is phosphorylated to a similar extent in the three experimental groups, but the translocation of the glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane is specifically inhibited in fructose-supplemented rats (Fig. 9c). The mechanism for insulin-induced GLUT4 translocation involves the binding of phosphorylated AS160 to 14-3-3, which promotes the movement of GLUT4 storage vesicles to fuse with the plasma membrane<sup>48</sup>. Our results do not allow to establish the molecular mechanism by which GLUT4 translocation to the plasma membrane of skeletal muscle is altered by sugar supplementation, as AS160 phosphorylation is similarly increased in both glucose- and fructose-supplemented rats and neither the amount of 14-3-3 nor the mRNA expression of proteins involved in the fusion of GLUT4 vesicles to the membrane are modified (Fig. 9a,c,d). However, the reduction of GLUT4 expression in the plasma membrane



**Figure 7. Insulin signaling in target tissues from rats of experiment 2.** Protein expression of total and phosphorylated-AKT in the liver (a), vWAT (b) and skeletal muscle (c) of control, glucose- and fructose-supplemented rats injected with saline (n = 4/group) or insulin (n = 6/group). Bars represent the mean ± sd, and representative western blots corresponding to 3 different rats for each condition are shown. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 (one-way ANOVA and Bonferroni post test).



**Figure 8.** mRNA levels of key enzymes involved in triglyceride synthesis and inflammation in vWAT: (a) *dgat2*, (b) *fas*, (c) *scd1*, (d) *mcp-1* and (e) *tnf-α*. Bars represent the mean  $\pm$  sd of values obtained from rats from experiment 2 injected with saline ( $n = 4$ /group). (f) Concentration of NEFA in plasma samples. Bars represent the mean  $\pm$  sd of values obtained from rats from experiment 2 injected with saline ( $n = 4$ /group) or insulin ( $n = 6$ /group). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (one-way ANOVA and Bonferroni post test).

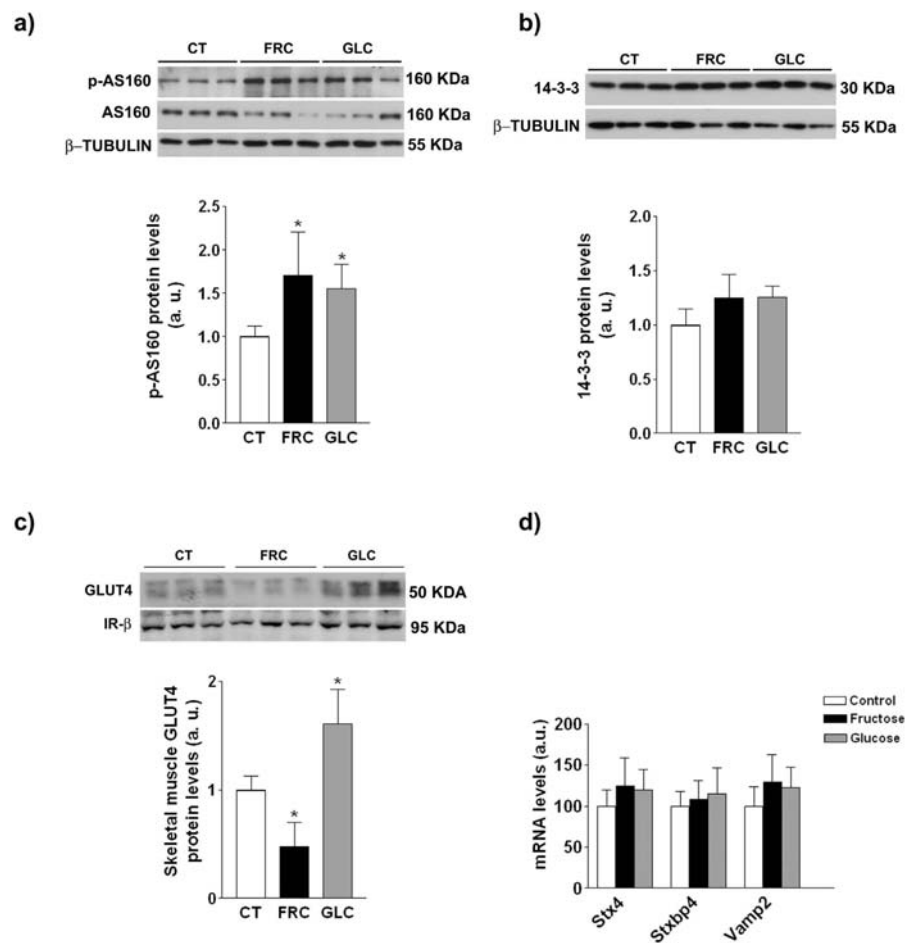
of skeletal muscle suggests that the high plasma glucose levels observed in the GTT in fructose-fed rats are a consequence of reduced glucose uptake in this tissue and not of increased hepatic glucose production. Similar results were observed in male Wistar rats fed a solid diet with 60% fructose for 6 weeks<sup>49</sup>.

Few human intervention studies have determined muscle insulin sensitivity after high fructose consumption, and the most of these did not detect any effect<sup>32,50–52</sup>. However, these studies have generally been small, performed on young healthy individuals, and short (1–4 weeks), whereas consumption of fructose-rich diets in the general population may span many years and include people with genetic backgrounds prone to metabolic diseases, such as obesity. In this sense, a longer intervention study (10 weeks) has demonstrated reduced insulin sensitivity in overweight/obese subjects consuming fructose but not glucose at the same % of energy requirements<sup>3</sup>.

We can conclude that with the exception of mTOR activation, molecular changes in liver, vWAT and skeletal muscle are related to fructose-induced insulin resistance, and rather than being directly related to the amount of calories ingested, are produced by fructose itself. The reduction of hepatic IRS-2 in fructose-supplemented rats can be interpreted as the combined effect of mTOR activation (induced by the excess of sugar-related calories consumed) and miRNA induction, an effect that is probably particular to fructose.

One of the strengths of our study is the inclusion of glucose-supplemented rats whose calorie consumption was matched to that of fructose-supplemented animals, allowing us to demonstrate that the effects of fructose on insulin sensitivity are specific and independent from the amount of calories provided by its consumption. Moreover, we want to highlight that in our study we simultaneously assessed the response to insulin and the mechanisms involved in the three target tissues (adipose, liver and skeletal muscle), thus obtaining a complete picture of whole-body insulin sensitivity.

However, our study also presents some limitations, besides the difficulties entailed in directly extrapolating results obtained in experimental animals to humans. These are: 1. We used female rats, and we cannot be sure that the same effects would be observed in male rats; 2. high consumption of sugar-sweetened beverages often cluster with other bad dietary habits in a Western-type diet, high in calories and saturated fats and poor in complex carbohydrates and micronutrients; 3. We used simple sugar solutions with concentrations (10% w/v) very close to those of sugar-sweetened beverages consumed by humans; however, to obtain meaningful results within a reasonable timeframe, rats were given *ad libitum* access to these solutions. As a consequence, around 60% of their total daily energy ingestion came from fructose or glucose, whereas heavy consumers in human populations obtain a maximum of 20–25% of their daily energy intake from simple sugars. In future research projects, we will



**Figure 9.** Effects of sugar supplementation on the expression of proteins involved in glucose transport in skeletal muscle. Protein expression of phosphorylated and total AS160 (a), 14-3-3 (b) in whole skeletal muscle protein extracts, and of GLUT4 in a plasma membrane fraction isolated from skeletal muscle (c) of control, fructose- and glucose-supplemented rats from experiment 2 after insulin injection. Bars represent the mean  $\pm$  sd of values obtained from  $n = 6$  rats/group. Representative western blots corresponding to 3 different rats for each condition are shown. (d) mRNA levels of *vamp2*, *stx4* and *stxbp4* in skeletal muscle of control, fructose- and glucose-supplemented rats from experiment 2 after insulin injection. Bars represent the mean  $\pm$  sd of values obtained from  $n = 6$  rats/group. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (one-way ANOVA and Bonferroni post test).

attempt to address these questions by restricting the amount of total calories obtained from sweetened beverages, while increasing the length of treatments and the type of solid chow consumed.

## References

- Chen, L., Magliano, D. J. & Zimmet, P. Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8**, 228–236 (2011).
- Havel, P. J. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr. Rev.* **63**, 133–157 (2005).
- Stanhope, K. L. *et al.* Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increase visceral adiposity and lipids and decrease insulin sensitivity in overweight/obese men. *J. Clin. Invest.* **133**, 1322–1334 (2009).
- Alegret, M., Roglans, N. & Laguna, J. C. Fructose consumption and leptin resistance: what have we learnt from animal studies in *Leptin: Hormonal Functions, Dysfunctions and Clinical Uses* (eds. Hemling, R. M. *et al.*) 209–230 (Nova Science Publishers, 2011).
- Vartanian, L. R., Schwartz, M. B. & Brownell, K. D. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Public Health* **97**, 667–75 (2007).
- Goran, M. I. *et al.* The obesogenic effect of high fructose exposure during early development. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**, 494–500 (2013).
- O'Connor, L. *et al.* Prospective associations and population impact of sweet beverage intake and type 2 diabetes, and effects of substitutions with alternative beverages. *Diabetologia* **58**, 1474–1483 (2015).
- Sievenpiper, J. L. *et al.* Fructose vs. glucose and metabolism: do the metabolic differences matter? *Curr. Opin. Lipidol.* **25**, 8–19 (2014).

9. Tappy, L., Lê, K. A., Tran, C. & Paquot, N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition* **26**, 1044–1049 (2010).
10. Vilà, L. *et al.* Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 741–751 (2011).
11. Rebollo, A. *et al.* Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 250–258 (2014).
12. Sengupta, P. The laboratory rat: relating age with human's. *Int J Prev Med* **4**, 624–630 (2013).
13. Benhamed, F. *et al.* The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **122**, 2176–2194 (2012).
14. Baena, M. *et al.* Fructose supplementation impairs rat liver autophagy through mTORC activation without inducing endoplasmic reticulum stress. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, 107–116 (2015).
15. Roglans, N. *et al.* Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR $\alpha$  activity in fructose-fed rats. *Hepatology* **45**, 778–788 (2007).
16. Elias, I. *et al.* Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* **61**, 1801–1813 (2012).
17. Roglans, N. *et al.* Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 232–239 (2002).
18. Burdge, G. C., Wright, P., Jones, A. E. & Wootton, S. A. A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction. *Br. J. Nutr.* **84**, 781–787 (2000).
19. Peter, A. *et al.* Hepatic lipid composition and stearyl-coenzyme A desaturase 1 mRNA expression can be estimated from plasma VLDL fatty acid ratios. *Clin. Chem.* **55**, 2113–2120 (2009).
20. Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P. & Gretz, N. MiRWalk - Database: Prediction of possible miRNA binding sites by 'walking' the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* **44**, 839–847 (2011).
21. Hsu, S.-D. *et al.* MiRTarBase: A database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* **39**, 163–169 (2011).
22. Helenius, M., Hänninen, M., Lehtinen, S. K. & Salminen, A. Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF- $\kappa$ B transcription factor in mouse cardiac muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 487–498 (1996).
23. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
24. Nishiumi, S. & Ashida, H. Rapid preparation of a plasma membrane fraction from adipocytes and muscle cells: application to detection of translocated glucose transporter 4 on the plasma membrane. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2343–2346 (2007).
25. Yue, Y. *et al.* A central role for the mammalian target of rapamycin in LPS-induced anorexia in mice. *J. Endocrinol.* **224**, 37–47 (2015).
26. Hsu, C.-K., Lin, C.-C., Hsiao, L.-D. & Yang, C.-M. Mevastatin ameliorates sphingosine 1-phosphate-induced COX-2/PGE $_2$ -dependent cell migration via FoxO1 and CREB phosphorylation and translocation. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 5360–5376 (2015).
27. Vilà, L. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology* **48**, 1506–1516 (2008).
28. Vilà, L. *et al.* Reduction of liver fructokinase expression and improved hepatic inflammation and metabolism in liquid fructose-fed rats after atorvastatin treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **251**, 32–40 (2011).
29. Rebollo, A. *et al.* Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 514–524 (2014).
30. Huang, D. *et al.* Fructose impairs glucose-induced hepatic triglyceride synthesis. *Lipids Health Dis.* **10**, 20 (2011).
31. Ouyang, X. *et al.* Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **48**, 993–999 (2008).
32. Lê, K. A. *et al.* Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 1760–1765 (2009).
33. Abdelmalek, M. F. *et al.* Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **51**, 1961–1971 (2010).
34. Neuschwander-Tetri, B. A. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* **52**, 774–788 (2010).
35. Hodson, L. & Fielding, B. A. Stearyl-CoA desaturase: rogue or innocent bystander? *Prog. Lipid Res.* **52**, 15–42 (2013).
36. Silbernagel, G., Machann, J., Häring, H.-U., Fritsche, A. & Peter, A. Plasminogen activator inhibitor-1, monocyte chemoattractant protein-1, e-selectin and C-reactive protein levels in response to 4-week very-high-fructose or -glucose diets. *Eur. J. Clin. Nutr.* **68**, 97–100 (2013).
37. Pawar, A. & Jump, D. B. Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor activity in rat primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 35931–35939 (2003).
38. Bergheim, I. *et al.* Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J. Hepatol.* **48**, 983–992 (2008).
39. Spruss, A. *et al.* Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* **50**, 1094–1104 (2009).
40. Goedeke, L. *et al.* A regulatory role for microRNA 33\* in controlling lipid metabolism gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2339–2352 (2013).
41. McCann, S. E. *et al.* Reduction of dietary glycaemic load modifies the expression of microRNA potentially associated with energy balance and cancer pathways in pre-menopausal women. *Br. J. Nutr.* **109**, 585–588 (2013).
42. Alisi, A. *et al.* Mirnome analysis reveals novel molecular determinants in the pathogenesis of diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Lab. Invest.* **91**, 283–293 (2011).
43. Karpe, F., Dickmann, J. R. & Frayn, K. N. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes* **60**, 2441–2449 (2011).
44. Nielsen, T. S., Jessen, N., Jørgensen, J. O. L., Møller, N. & Lund, S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol.* **52**, R199–R222 (2014).
45. Crescenzo, R. *et al.* Adipose tissue remodeling in rats exhibiting fructose-induced obesity. *Eur. J. Nutr.* **53**, 413–419 (2013).
46. Jia, G., Aroor, A. R., Martinez-Lemus, L. A. & Sowers, J. R. Overnutrition, mTOR signaling, and cardiovascular diseases. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **307**, R1198–R1206 (2014).
47. DeFronzo, R. A. & Tripathy, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **32** Suppl 2, S157–S163 (2009).
48. Sakamoto, K. & Holman, G. D. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E29–E37 (2008).
49. Li, P. *et al.* A high-fructose diet impairs Akt and PKC $\zeta$  phosphorylation and GLUT4 translocation in rat skeletal muscle. *Horm. Metab. Res.* **40**, 528–532 (2008).
50. Faeh, D. *et al.* Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic *de novo* lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes* **54**, 1907–1913 (2005).

51. Lê, K. A. *et al.* A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 1374–1379 (2006).
52. Aeberli, I. *et al.* Moderate amounts of fructose consumption impair insulin sensitivity in healthy young men: a randomized controlled trial. *Diabetes Care* **36**, 150–156 (2013).

### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, SAF2013-42982-R and European Commission FEDER funds. Miguel Baena and Gemma Sangüesa were supported by FPI and FPU grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation, respectively. Aleix Sala-Vila holds a Miguel Servet I fellowship from ISCIII (CP12/03299). We are a Consolidated Research Group of the Autonomous Government of Catalonia (2014 SGR0066). We would like to thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for revising the manuscript.

### Author Contributions

M.B. and G.S. processed the samples, conducted most of the experiments and analysed and prepared the data. A.D. and M.J.L. conducted the miRNA analysis. A.S.-V. analysed the fatty acid composition of hepatic triglycerides. R.M.S. and N.R. contributed to data interpretation, produced illustrations and revised the article. J.C.L. and M.A. wrote and edited the manuscript and secured the funding. M.A. and J.C.L. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the study data and assume responsibility for data integrity and the accuracy of data analysis. All authors approved the final version of the manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

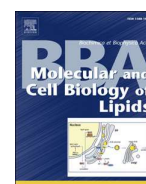
**How to cite this article:** Baena, M. *et al.* Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the three major insulin-sensitive tissues. *Sci. Rep.* **6**, 26149; doi: 10.1038/srep26149 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>







## Fructose supplementation impairs rat liver autophagy through mTORC activation without inducing endoplasmic reticulum stress



Miguel Baena<sup>a</sup>, Gemma Sangüesa<sup>a</sup>, Natalia Hutter<sup>a</sup>, Rosa M. Sánchez<sup>a,b,c</sup>, Núria Roglans<sup>a,b,c</sup>, Juan C. Laguna<sup>a,b,c</sup>, Marta Alegret<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

<sup>b</sup> IBUB Institute of Biomedicine, University of Barcelona, Spain

<sup>c</sup> CIBERObn Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 July 2014

Received in revised form 14 October 2014

Accepted 4 November 2014

Available online 9 November 2014

#### Keywords:

Fructose  
Hepatic steatosis  
Autophagy  
mTORC

### ABSTRACT

Supplementation with 10% liquid fructose to female rats for 2 weeks caused hepatic steatosis through increased lipogenesis and reduced peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)  $\alpha$  activity and fatty acid catabolism, together with increased expression of the spliced form of X-binding protein-1 (Rebollo et al., 2014). In the present study, we show that some of these effects are preserved after sub-chronic (8 weeks) fructose supplementation, specifically increased hepatic expression of lipid synthesis-related genes (stearoyl-CoA desaturase,  $\times 6.7$ -fold; acetyl-CoA carboxylase,  $\times 1.6$ -fold; glycerol-3-phosphate acyltransferase,  $\times 1.65$ -fold), and reduced fatty acid  $\beta$ -oxidation ( $\times 0.77$ -fold), resulting in increased liver triglyceride content ( $\times 1.69$ -fold) and hepatic steatosis. However, hepatic expression of PPAR $\alpha$  and its target genes was not modified and, further, livers of 8-week fructose-supplemented rats showed no sign of unfolded protein response activation, except for an increase in p-IRE1 levels. Hepatic mTOR phosphorylation was enhanced ( $\times 1.74$ -fold), causing an increase in the phosphorylation of UNC-51-like kinase 1 (ULK-1) ( $\times 2.8$ -fold), leading to a decrease in the ratio of LC3B-II/LC3B-I protein expression ( $\times 0.39$ -fold) and an increase in the amount of the autophagic substrate p62, indicative of decreased autophagy activity. A harmful cycle may be established in the liver of 8-week fructose-supplemented rats where lipid accumulation may cause defective autophagy, and reduced autophagy may result in decreased free fatty acid formation from triglyceride depots, thus reducing the substrates for  $\beta$ -oxidation and further increasing hepatic steatosis. In summary, the length of supplementation is a key factor in the metabolic disturbances induced by fructose: in short-term studies, PPAR $\alpha$  inhibition and ER stress induction are critical events, whereas after sub-chronic supplementation, mTOR activation and autophagy inhibition are crucial.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** ACC, acetyl-CoA carboxylase; AMPK, AMP-activated protein kinase; ATF-6, activating transcription factor-6; CHOP, C/EBP homologous protein; Dnajb9, Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9; 4E-BP1, eIF4E-binding protein; EDEM1, ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1; ER, endoplasmic reticulum; FAS, fatty acid synthase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GK, glucokinase; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; GRP, glucose regulated protein; GSK3 $\beta$ , glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; HNF4, hepatic nuclear factor 4; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; JNK, c-Jun-NH2-terminal kinase; LAMP-1, lysosome-associated membrane glycoprotein-1; LC3B, autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B; L-CPT-I, liver carnitinepalmitoyl-CoA transferase I; LDH, lactate dehydrogenase; L-PK, liver-pyruvate kinase; mTOR(C), mammalian target of rapamycin (complex); NAMPT, nicotinamide phosphoribosyltransferase; p38 MAPK, protein 38 mitogen activated protein kinase; PERK, protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase; PGC-1 $\alpha$ , peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$ ; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ ; Rheb, Ras homolog enriched in brain; SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1; SIRT1, sirtuin 1; sXBP-1, X-box binding protein 1, spliced form; SREBP, sterol response element binding protein; Tel2, telomere maintenance 2; Tsc2, tuberous sclerosis complex 2; ULK-1, UNC-51-like kinase 1

\* Corresponding author at: Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII 27–31, Barcelona 08028, Spain. Tel.: +34 93 402 4531x28; fax: +34 93 403 5982.

E-mail address: [alegret@ub.edu](mailto:alegret@ub.edu) (M. Alegret).

### 1. Introduction

Fructose is a natural sugar contained in fruits and honey which is used as an added sugar to sweeten foods and beverages during processing or preparation. Global changes in dietary habits have led to an increase in added sugar consumption in recent decades [1], which has been linked to increased trends in obesity, dyslipidemia, fatty liver and type 2 diabetes [2–5]. Specifically, fructose rather than glucose has been reported to be responsible for the metabolic disturbances observed, such as obesity or liver fat deposition [6]. Recently, it has been shown that feeding mice a high fructose diet causes hepatic steatosis due to increased de novo lipogenesis linked to endoplasmic reticulum (ER) stress [7,8].

Rats are used more frequently than mice as models to investigate the mechanisms by which fructose causes metabolic alterations. The rat is a good model for the study of fructose metabolism because unlike other animal species but similar to humans, it does not transform ingested fructose into glucose due to a lack of intestinal glucose-6 phosphatase

[9]. Our laboratory has researched several issues regarding the molecular effects of fructose on liver fat and glucose metabolism after short-term consumption (7 or 14 days) of a 10% w/v fructose solution [10–16]. These studies have demonstrated that fructose supplementation to female Sprague–Dawley rats for 14 days significantly changes the activity and expression of key nutrient-sensing molecules in the liver, such as the mammalian target of rapamycin (mTOR) [15], a protein kinase which signals in at least two distinct multiprotein complexes (mTORC). Specifically, we observed that fructose supplementation stimulated Ser-2481 mTOR phosphorylation, which is considered a marker of mTORC activity [17]. However, it is still unknown whether the observed mechanisms are also activated after longer periods of fructose supplementation, which would better mimic the usual pattern of fructose consumption in the human population. Therefore, in the present study we supplemented female Sprague–Dawley rats with a 10% w/v fructose solution for 8 weeks, a sub-chronic regime which roughly corresponds to a 6-year period of daily fructose consumption in humans [18]. Our results show that some of the metabolic disturbances observed in earlier short-term studies, such as hepatic steatosis, increased fatty acid synthesis and inhibition of oxidation, are still observed after 8 weeks, whereas PPAR $\alpha$  inhibition is absent. In addition, although there are no signs of hepatic ER stress, our results show decreased autophagy which may be linked to mTOR activation in the liver.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and experimental design

Female Sprague–Dawley rats (Charles River, Barcelona, Spain) were maintained with water and food *ad libitum* at constant humidity and temperature, with a light/dark cycle of 12 h, and were randomly assigned to a control group and a fructose-supplemented group (8 and 12 rats per group, respectively). Female rats were used because they are more sensitive to the deleterious effects of fructose on glucose homeostasis than male rats [13]. Fructose was supplied as a 10% (w/v) solution in drinking water for 8 weeks. Food and liquid intakes were measured daily per 2 rats housed in a cage. The amount of food consumed was measured by subtracting the weight of the remaining pellets from the initial weight of pellets provided. Liquid intake was calculated as the difference between the remaining volume of liquid in the bottle and the initial volume provided (both measured with a graduated cylinder). After 8 weeks, food and fructose were removed at 8 a.m. and the animals were sacrificed by decapitation under isoflurane anesthesia at 10 a.m. To reduce variability in plasma estrogen concentrations, female rats were sacrificed during the diestrus period.

Blood and liver tissue samples were collected and stored as described elsewhere [11]. All procedures were conducted in accordance with the guidelines established by the University of Barcelona's Bioethics Committee (Autonomous Government of Catalonia Act 5/1995, July 21).

### 2.2. Sample preparations

Total and nuclear extracts from rat liver were isolated by the Helenius method [19]. Protein concentrations were determined by the Bradford method [20].

### 2.3. Lipid and lipoprotein analysis

Plasma triglycerides were measured using an Accutrend® Plus System glucometer (Roche Farma, Barcelona, Spain). Plasma cholesterol was determined by Cholesterol CHOD-POD colorimetric test (Spinreact, Girona, Spain).

Size fractionation of plasma lipoproteins was performed by fast performance liquid chromatography (FPLC) of pooled filtered plasma

samples as previously described [21], and total cholesterol and triglyceride content in each fraction was then assayed.

Liver triglycerides were extracted and measured as described by Roglans et al. [10].

### 2.4. Enzyme activity assays

Hepatic fatty acid  $\beta$ -oxidation activity was determined in rat livers as in [22], with 30  $\mu$ g of postnuclear supernatant.

### 2.5. RNA preparation and analysis

Total RNA was isolated by using the Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. Specific mRNAs were assessed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using SYBR green PCR Master Mix, specific primers and the Applied Biosystems One-Step Plus sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As internal control, TATA box binding protein (tbp) was used. Primer sequences and PCR product length are listed in Supplementary Table 1.

### 2.6. Western blot analysis

30  $\mu$ g of different protein fractions from rat livers was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis [8,9]. Proteins were then transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride transfer membranes (Millipore, Billerica, MA, USA), blocked for 1 h at room temperature with 5% non-fat milk solution in 0.1% Tween-20-Tris-buffered saline (TBS), and incubated as described previously [11]. Detection was performed using the ECL chemiluminescence kit for HRP (Amersham GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain). To confirm the uniformity of protein loading, blots were incubated with  $\beta$ -tubulin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as a control. Primary antibodies for phospho- and total ACC, AMPK GSK3 $\beta$  and 4E-BP1 were supplied by Cell Signaling (Danvers, MA, USA), those for PPAR $\alpha$  and p62 were obtained from AbCam (Cambridge, UK), and the antibody against phospho-mTOR was purchased from Millipore (Billerica, MA, USA). The rest of the antibodies used were from Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA).

### 2.7. Co-immunoprecipitation

250  $\mu$ g of protein extracts was incubated with 4  $\mu$ g of anti-acetylated-lysine, Rheb and mTOR antibodies (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) in a final volume of 0.5 mL with buffer containing 10 mM PBS and 2% BSA for 4 h at 4 °C. Immunocomplexes were captured by incubating the samples with protein A/G PLUS-Agarose suspension (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), overnight at 4 °C on a rocker platform. Agarose beads were collected by centrifugation and washed three times with lysis buffer (RIPA buffer containing protease inhibitors). After microcentrifugation, the pellet was resuspended with 40  $\mu$ l of SDS-PAGE sample buffer and boiled for 5 min to elute the samples. The supernatant was subjected to electrophoresis in 10% SDS-PAGE (or 7% for mTOR detection) and immunoblotted with an antibody against GAPDH, mTOR (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Rag C (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) and Tel2 (ProteinTech, Manchester, UK). To avoid interference of signal detection by the immunoglobulin heavy and light chains, Rabbit IgG TrueBlot Antibody Peroxidase Conjugate (eBioscience) was used.

### 2.8. Histological studies

Lipid accumulation was analyzed in the liver sections stained with Oil Red O. Images were acquired with an Olympus BX71 microscope equipped with a DP72 camera and analyzed by a registered pathologist at BioBanc (Banc de tumors-IDIBAPS, Barcelona, Spain), who was

**Table 1**

Effects of 10% w/v fructose supplementation for 8 weeks on liquid and food ingestion, zoometric parameters and plasma and liver lipid levels.

	Control (n = 5)	Fructose (n = 8)
AUC ingested liquid (ml/days/2 rats)	3044 ± 412	14422 ± 1320***
AUC consumed diet (g/days/2 rats)	1779 ± 17	1041 ± 39***
AUC body weight (g/days/rat)	12873 ± 477	14107 ± 685**
Final body weight (g)	265 ± 10	289 ± 20*
Adipose tissue weight (g)	6.02 ± 1.01	11.20 ± 3.32**
% adipose tissue weight	2.3 ± 0.4	3.8 ± 0.9**
Liver weight (g)	7.46 ± 0.40	9.52 ± 1.17**
% liver weight	2.8 ± 0.1	3.3 ± 0.2**
Hepatic triglycerides (mg/g liver)	4.9 ± 1.2	6.2 ± 1.9
Plasma triglycerides (mg/dl)	86 ± 8	145 ± 10***
Plasma cholesterol (mg/dl)	160 ± 3	164 ± 8

% referred to total body weight.

\* p &lt; 0.05.

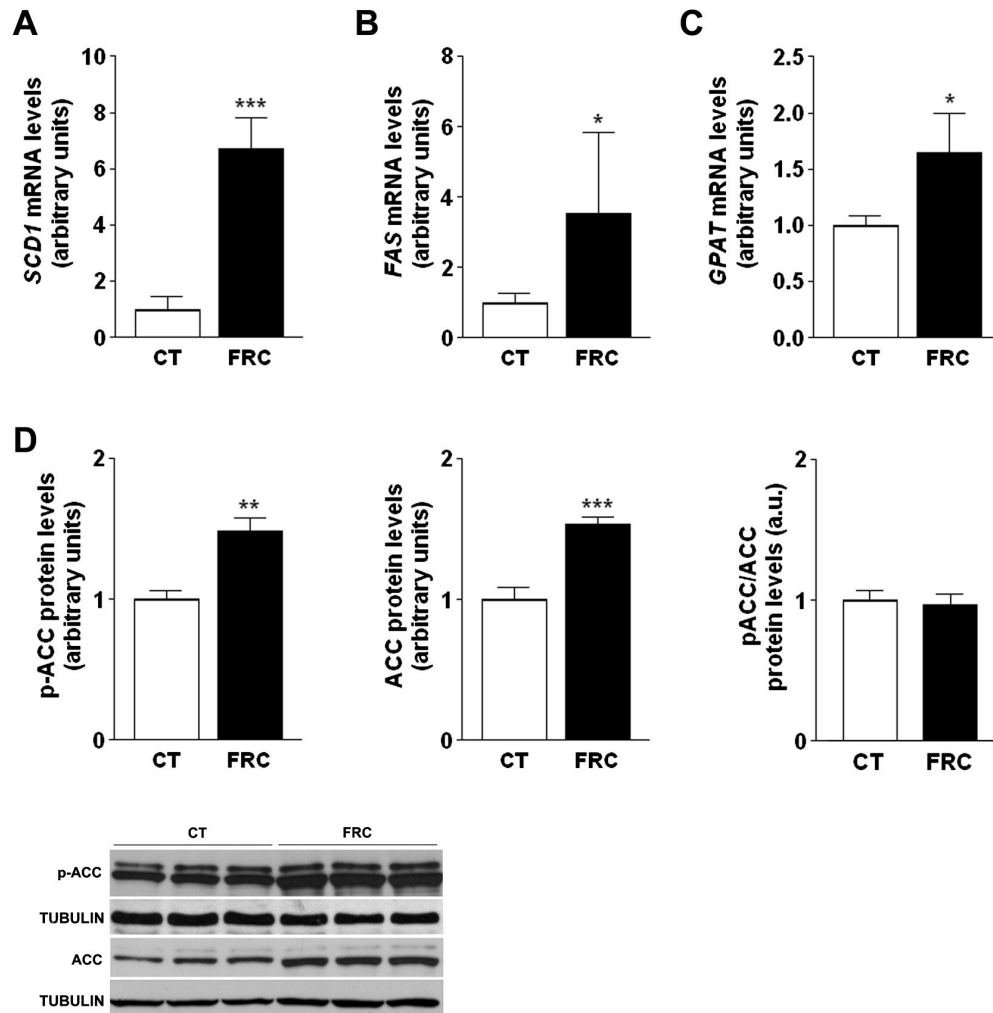
\*\* p &lt; 0.01.

\*\*\* p &lt; 0.001.

**Table 2**Effect of 10% liquid fructose supplementation for 8 weeks on hepatic fatty acid  $\beta$ -oxidation activity and expression of related genes and kinases.

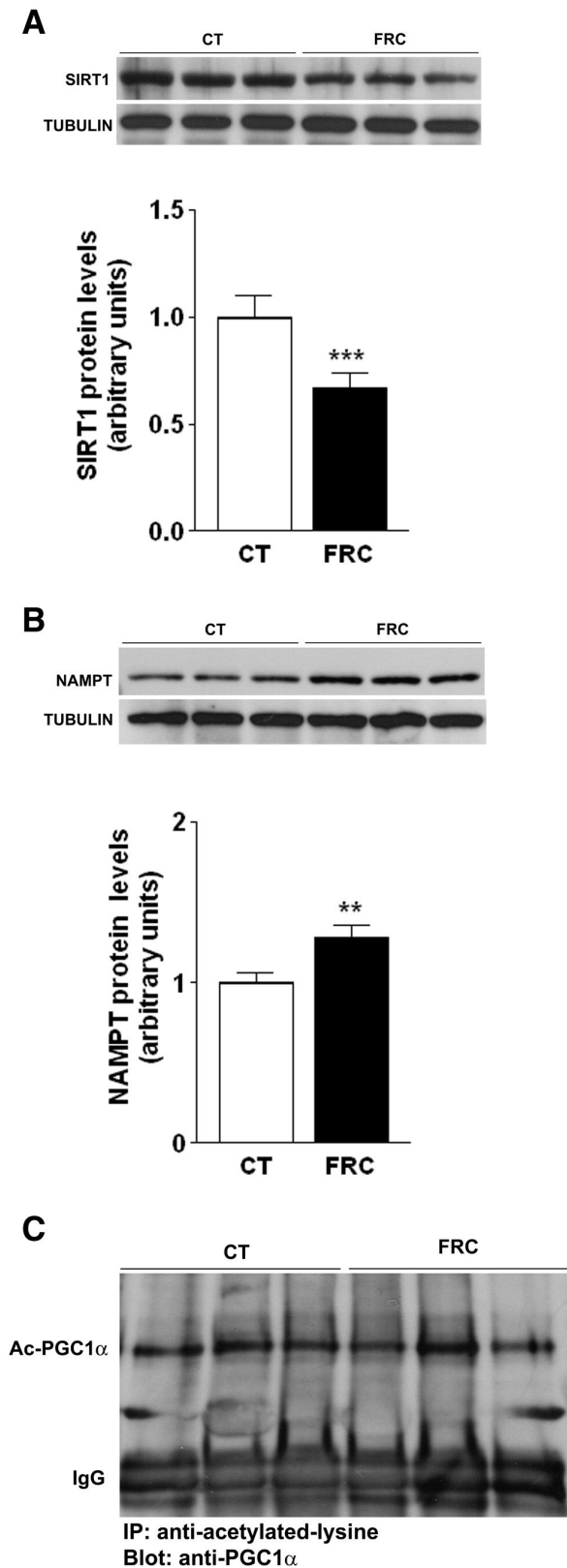
$\beta$ -oxidation activity	Control (n = 5)	Fructose (n = 8)
nmol/min/mg protein	0.49 ± 0.10	0.36 ± 0.07*
Gene	Control (n = 5)	Fructose (n = 8)
<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	1.00 ± 0.04	0.92 ± 0.11
<i>HNF4</i>	1.00 ± 0.10	0.78 ± 0.90*
<i>L-cpt-1</i>	1.00 ± 0.06	1.15 ± 0.33
Protein	Control (n = 4)	Fructose (n = 5)
<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	1.00 ± 0.11	1.22 ± 0.10*
<i>HNF4</i>	1.00 ± 0.10	0.97 ± 0.05
p-AMPK	1.00 ± 0.12	0.85 ± 0.10
AMPK	1.00 ± 0.04	0.97 ± 0.04
p-Akt	1.00 ± 0.10	0.98 ± 0.07
Akt	1.00 ± 0.09	1.02 ± 0.14
p-ERK	1.00 ± 0.27	0.92 ± 0.14
ERK	1.00 ± 0.17	0.90 ± 0.05
p-GSK3 $\beta$	1.00 ± 0.16	0.92 ± 0.07
GSK3 $\beta$	1.00 ± 0.09	0.97 ± 0.06

\* p &lt; 0.05.



**Fig. 1.** Fructose effects on markers of hepatic fatty acid and triglyceride synthesis. mRNA levels of SCD-1 (A), FAS (B) and GPAT (C) expressed as mean  $\pm$  sd from 5 control and 8 fructose-supplemented rats. (D) Western-blot of phospho- and total ACC proteins in liver samples from control and fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown (n. s., non-specific band). Bar plots show the levels of each protein and the ratio between the phosphorylated and the total ACC protein expressed as the mean (arbitrary units)  $\pm$  sd of the values obtained in samples from 4 control and 5 fructose-supplemented rats. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

unaware of the treatment groups. The area of positive staining for Oil Red O was calculated as a percentage of stained cells/total section area in each sample.



## 2.9. Statistics

The results are expressed as the mean of  $n$  values  $\pm$  standard deviation. Plasma samples were assayed in duplicate. Significant differences were established by the unpaired  $t$ -test (GraphPad Software V2.03). When the number of samples was too small or variance was not homogeneous, a non-parametric test was performed. The level of statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Fructose supplementation for 8 weeks causes hypertriglyceridemia and increases body weight

Rats supplemented with 10% liquid fructose for 8 weeks drank more ( $\times 4.7$ -fold) and reduced the ingestion of solid food ( $\times 0.58$ -fold) compared with control rats (Table 1). However, this reduction was not sufficient to compensate for the calories obtained from fructose, which represented 63% of the total calories consumed. Thus, total caloric intake was 1.6-fold higher in fructose-supplemented than in control rats, and this resulted in a slight but significant increase in body weight throughout the treatment period and at the end of it ( $\times 1.09$ -fold) (Table 1). Liver and adipose tissue weights were also higher in fructose-supplemented rats either in absolute terms ( $\times 1.28$ -fold and  $\times 1.86$ -fold, respectively) or in percentage related to total body weight ( $\times 1.17$ -fold and  $\times 1.69$ -fold, respectively). Fructose-supplemented rats displayed hypertriglyceridemia ( $\times 1.69$ -fold), with no changes in plasma cholesterol levels (Table 1). FPLC analysis demonstrated that the increase in triglycerides after fructose treatment occurred exclusively in the VLDL fraction (Supplemental Fig. 1).

### 3.2. Fructose increases hepatic fatty acid synthesis and inhibits fatty acid $\beta$ -oxidation independently of PPAR $\alpha$ and SIRT1 activity

The hepatic mRNA expression of key genes related to fatty acid synthesis, such as stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and fatty acid synthase (FAS), was increased after fructose supplementation (Fig. 1A, B). In addition, hepatic mRNA expression of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), the enzyme that catalyzes the first step in triacylglycerol synthesis, was increased by 1.65-fold in the livers of fructose-supplemented rats (Fig. 1C). On the other hand, the protein expression of acetyl-CoA carboxylase (ACC) was also increased by fructose supplementation, with no modification of the degree of ACC activation determined as the ratio of phosphorylated versus total protein (Fig. 1D). Confirming our previous data [11–13,16], the expression of the mature form of SREBP-1c was not modified by fructose supplementation (data not shown).

Our previous results in female rats supplemented with liquid fructose for 14 days [16] showed that hepatic fatty acid  $\beta$ -oxidation was inhibited through reduced peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) expression and activity, related to a decrease in the expression and activity of the deacetylase sirtuin-1 (SIRT1). Our present data show that hepatic fatty acid  $\beta$ -oxidation activity was significantly reduced by 0.77-fold, but despite small changes in the hepatic expression of PPAR $\alpha$  and hepatic nuclear factor 4 (HNF4), a transcription factor which controls  $\beta$ -oxidation activity, the expression of the PPAR $\alpha$  target gene liver carnitine palmitoyl transferase I (L-CPT-I) was not reduced after 8 weeks of fructose supplementation (Table 2). Moreover, although we continued to observe a reduction in SIRT1 expression

**Fig. 2.** Fructose reduces liver SIRT1 expression but not PGC1 $\alpha$  acetylation. Western-blot of SIRT1 (A) and NAMPT (B) proteins in the livers of control and fructose-supplemented rats. Bar plots show the levels of each protein, expressed as the mean (arbitrary units)  $\pm$  sd of the values obtained in samples from 4 control and 5 fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. (C) Acetylated PGC1 $\alpha$  proteins in representative samples from three control and three fructose-supplemented rats. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

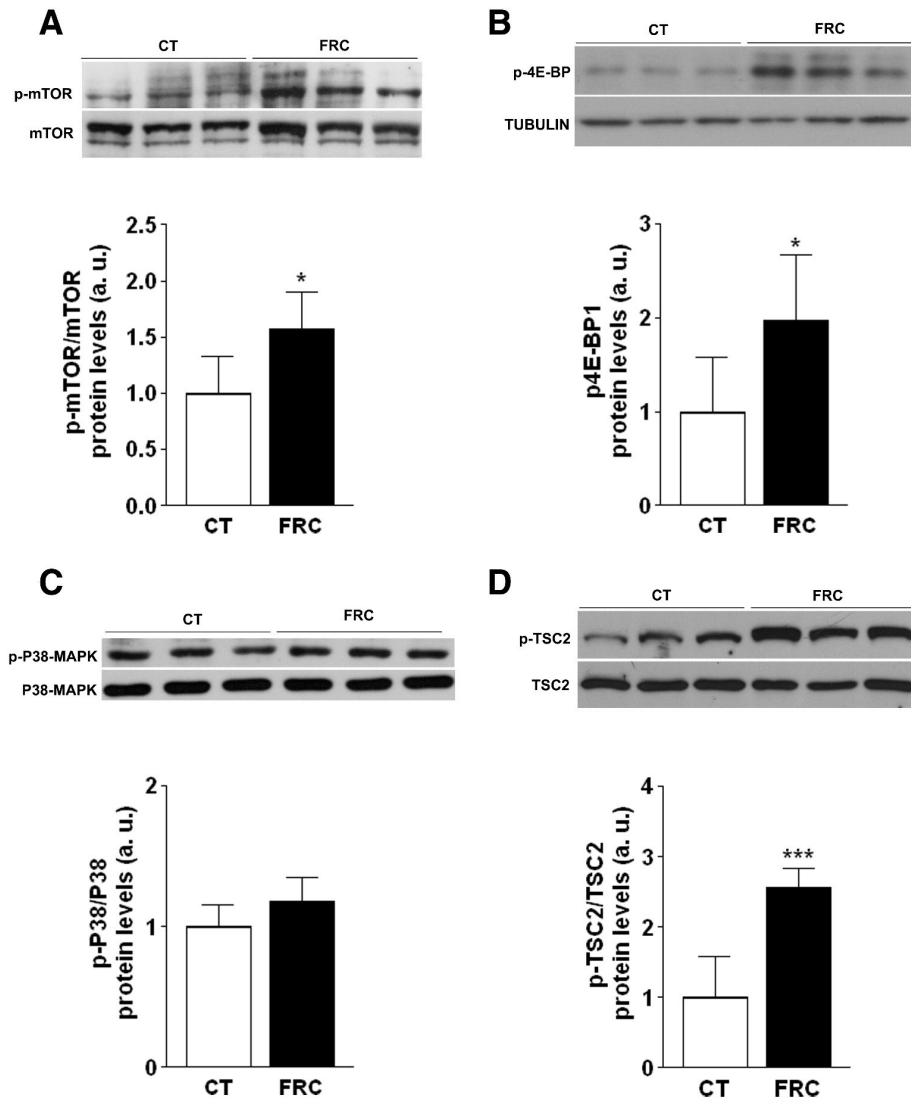
( $\times 0.67$ -fold, Fig. 2A) in livers of 8-week fructose-supplemented rats, the expression of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), an enzyme essential for the synthesis of  $\text{NAD}^+$  and SIRT1 activity, was increased by 1.28-fold (Fig. 2B). This suggests that there was no deficit in SIRT1 activity, corroborated by the fact that the degree of acetylation of the SIRT-1 substrate PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) was not affected by fructose supplementation (Fig. 2C). Furthermore, the amount of the phosphorylated, active form of adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK), a metabolic sensor that controls SIRT1 activity [23], was unchanged in the livers from fructose-fed rats (Table 2).

### 3.3. Fructose supplementation activates mTOR and promotes the transcription of genes in the glycolytic and pentose phosphate pathways

Our results show that there was a significant 1.57-fold increase in mTOR Ser-2481 phosphorylation (Fig. 3A) in the livers of rats supplemented with fructose for 8 weeks. Accordingly, there was a significant increase in the phosphorylation of its downstream effector 4E-BP1 at

Thr37/46, confirming the activation of mTORC1 (Fig. 3B). In our previous study on rats supplemented with liquid fructose for 14 days, we also found an increase in phosphorylated mTOR, which was attributed to an increase in the activity of protein 38-mitogen activated protein kinase (p38-MAPK) [15]. It has been described that p38-MAPK, by phosphorylating the tuberous sclerosis complex 2 (Tsc2), could release its inhibitory activity on mTORC1 [24]. However, despite a marked increase in phosphorylated Tsc2 (Fig. 3C) in the livers of 8-week fructose-supplemented rats, the activity of p38-MAPK remained unchanged (Fig. 3D), as did that of other kinases that may also be involved in Tsc2 phosphorylation (Table 2).

It has been shown that the activation of mTOR stimulates glycolysis and the pentose phosphate pathway through increased transcription of key genes involved in these metabolic routes [25]. Accordingly, fructose supplementation induced hepatic mRNA expression of the glycolytic enzymes liver-pyruvate kinase (L-PK), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and lactate dehydrogenase (LDH), as well as glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), a key enzyme of the



**Fig. 3.** Supplementation with fructose increases hepatic TSC2 and mTOR phosphorylation independently from p38-MAPK. Western-blot of phospho- and total mTOR (A), phosphorylated 4E-BP1 (B) and phospho- and total p38-MAPK (C) and TSC2 (D) proteins in the livers of control and fructose-supplemented rats. Bar plots show the expression of phosphorylated proteins versus the total or versus tubulin, expressed as the mean (a. u., arbitrary units)  $\pm$  sd of the values obtained in samples from 4 control and 5 fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

oxidative arm of the pentose phosphate pathway (Fig. 4A). Increased glycolysis seems to be specifically driven by fructose, as fructokinase expression was induced ( $\times 1.88$  fold) while glucokinase was not (Fig. 4B, C).

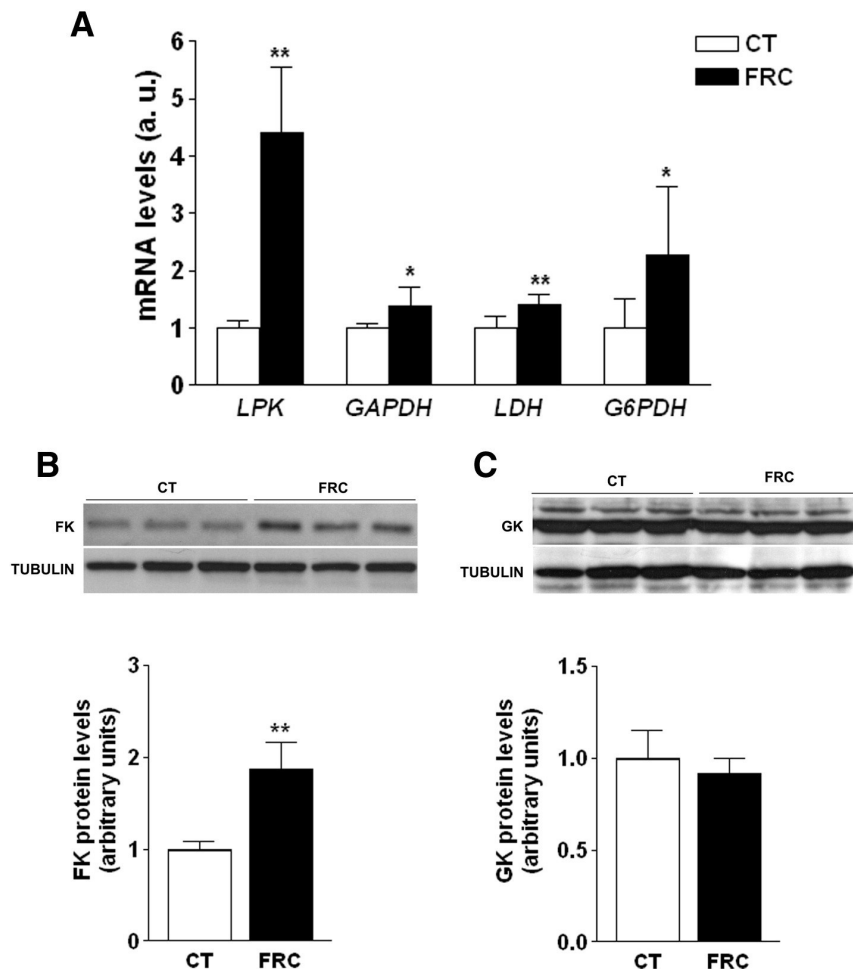
mTOR phosphorylation on Ser 2481, and thus mTORC activation, is also promoted by Ras homolog enriched in brain (Rheb) overexpression [26]. In liver samples from fructose-supplemented rats, we only observed a slight increase in Rheb protein levels (Supplemental Fig. 2A). It has been reported that under conditions of high glycolytic flux, there is an increase in Rheb availability to interact with and activate mTORC1, caused by the suppression of the interaction between GAPDH and Rheb [26]. To determine whether the increase in glycolysis found in the liver of fructose-supplemented rats could affect the interaction of Rheb with mTORC1, we performed co-immunoprecipitation experiments, which showed that neither Rheb–GAPDH nor Rheb–mTOR interactions were affected by fructose treatment. Further, Rag GTPases (RagC), which signal not only amino-acid but also glucose concentrations to mTORC1 [27], were neither involved (Supplemental Fig. 2B).

On the other hand, the assembly of mTORC components, and thus activation of the complexes, is regulated by the TTT multiprotein complex (Tel2, Tti1 and Tti2) through direct interaction with mTOR [28]. This mechanism does not seem to be involved in mTORC activation by fructose supplementation, as we did not observe any change in the

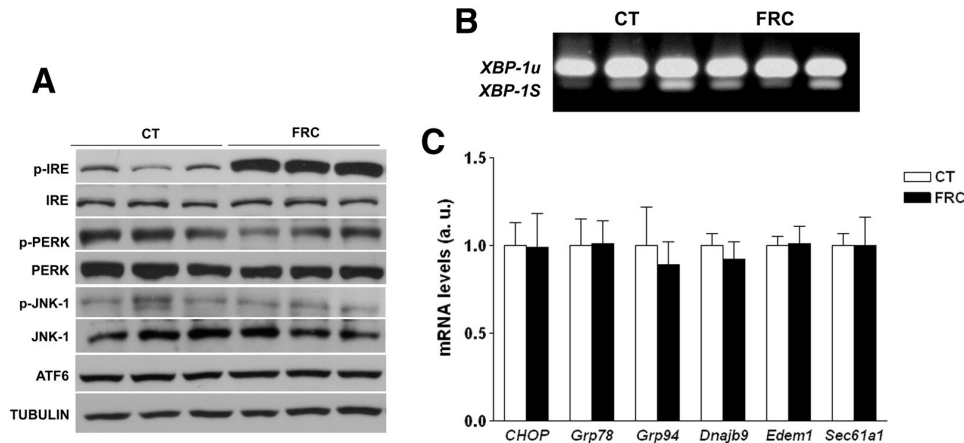
amount of Tel2 protein or in the interaction between Tel2 and mTOR in co-immunoprecipitation assays (Supplemental Fig. 2B).

#### 3.4. Fructose-driven hepatic steatosis does not induce ER stress in rats, while autophagy is inhibited

We were interested in determining the effect of fructose supplementation on endoplasmic reticulum (ER) stress response, as it has been shown to be induced in mice and rats with increased de novo lipogenesis after being fed a high fructose diet [7,8,29]. In our previous studies on 14-day fructose-supplemented female rats, we had observed higher levels of phosphorylated inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) and an increase in the spliced form of X-box binding protein 1 (sXBP-1) mRNA and nuclear protein, involved in the ER stress response [15]. However, in the livers of 8-week fructose-supplemented rats, although there was still an increase in p-IRE1 levels (Fig. 5A), indicative of activation, the protein levels of sXBP-1 were not increased (Fig. 5B). Neither did we observe activation of the stress kinase c-Jun-NH2-terminal kinase (JNK), which is a IRE1 downstream effector [30] (Fig. 5A). The other branches of the ER stress response, protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and activating transcription factor-6



**Fig. 4.** Fructose increases the transcription of genes involved in glycolysis and pentose phosphate pathways in the liver. (A) mRNA levels of L-PK, GAPDH, LDH and G6PDH in hepatic samples from control and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean (arbitrary units)  $\pm$  sd of the values obtained from 5 control and 8 fructose-supplemented animals. Western-blot of FK (B) and GK (C) proteins in the livers of control and fructose-supplemented rats. Bar plots show the levels of each protein, expressed as the mean (arbitrary units)  $\pm$  sd of the values obtained in the samples from 4 control and 5 fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .



**Fig. 5.** Fructose supplementation for 8 weeks increases hepatic p-IRE1, but not markers of ER stress response. (A) Western-blot of p- and total IRE, p- and total PERK, ATF6 $\alpha$ , and p- and total JNK proteins in the livers of control and fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. (B) Autoradiograph of an agarose gel showing bands corresponding to unspliced (u) and spliced (s) XBP-1 mRNA in liver samples corresponding to three control and three fructose-supplemented rats. (C) mRNA levels of ER stress markers CHOP, Grp78, Grp94, Dnajb9, Edem1 and Sec61a1 in hepatic samples from control and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean (arbitrary units)  $\pm$  sd of the values obtained from 5 control and 8 fructose-supplemented animals.

(ATF-6) and mRNA levels of several ER stress markers were also unaffected by fructose feeding (Fig. 5A, C).

Increased synthesis and reduced catabolism of fatty acids in the livers of fructose-supplemented rats resulted in hepatic steatosis as assessed by biochemical and histological analysis (Table 1 and Fig. 6). Hepatic lipid accumulation has been related to reduced autophagy [31]. Therefore, we were interested in studying autophagy activity in hepatic samples from control and fructose-supplemented rats. Our results show that the ratio of LC3B-II/LC3B-I protein expression, indicative of autophagic activity, was decreased by 60% in the livers of fructose-supplemented rats (Fig. 7A). mTORC1 has emerged as one of the repressors of autophagy, through phosphorylation of Ser 757 on UNC-51-like kinase 1 (ULK-1) [32]. In accordance with our results showing an increase in the phosphorylated active form of mTOR in hepatic samples from rats supplemented with fructose for 8 weeks, the amount of P-Ser<sup>757</sup>-ULK-1 was also increased by 2.8-fold (Fig. 7B). Moreover, the level of the autophagy target p62 was significantly higher in hepatic samples from fructose-supplemented rats (Fig. 7C). On the other hand, levels of the lysosomal marker lysosome-associated membrane glycoprotein-1 (LAMP-1) were not significantly modified (Fig. 7D).

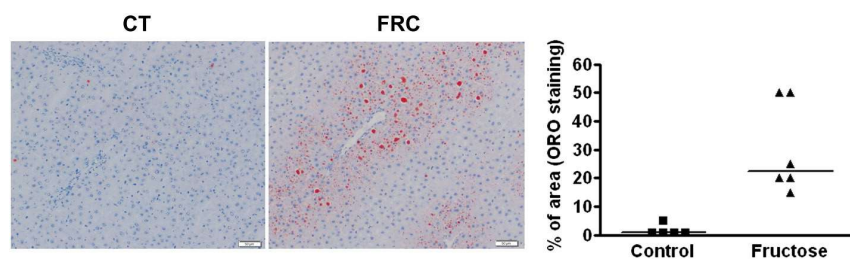
#### 4. Discussion

In a previous report, we demonstrated that fructose supplementation (10% w/v in liquid form) to female Sprague–Dawley rats for 14 days induced hepatic fatty acid synthesis and reduced  $\beta$ -oxidation [16]. Our present results show that a longer supplementation period (8 weeks) causes similar effects in fatty acid metabolism, but whereas

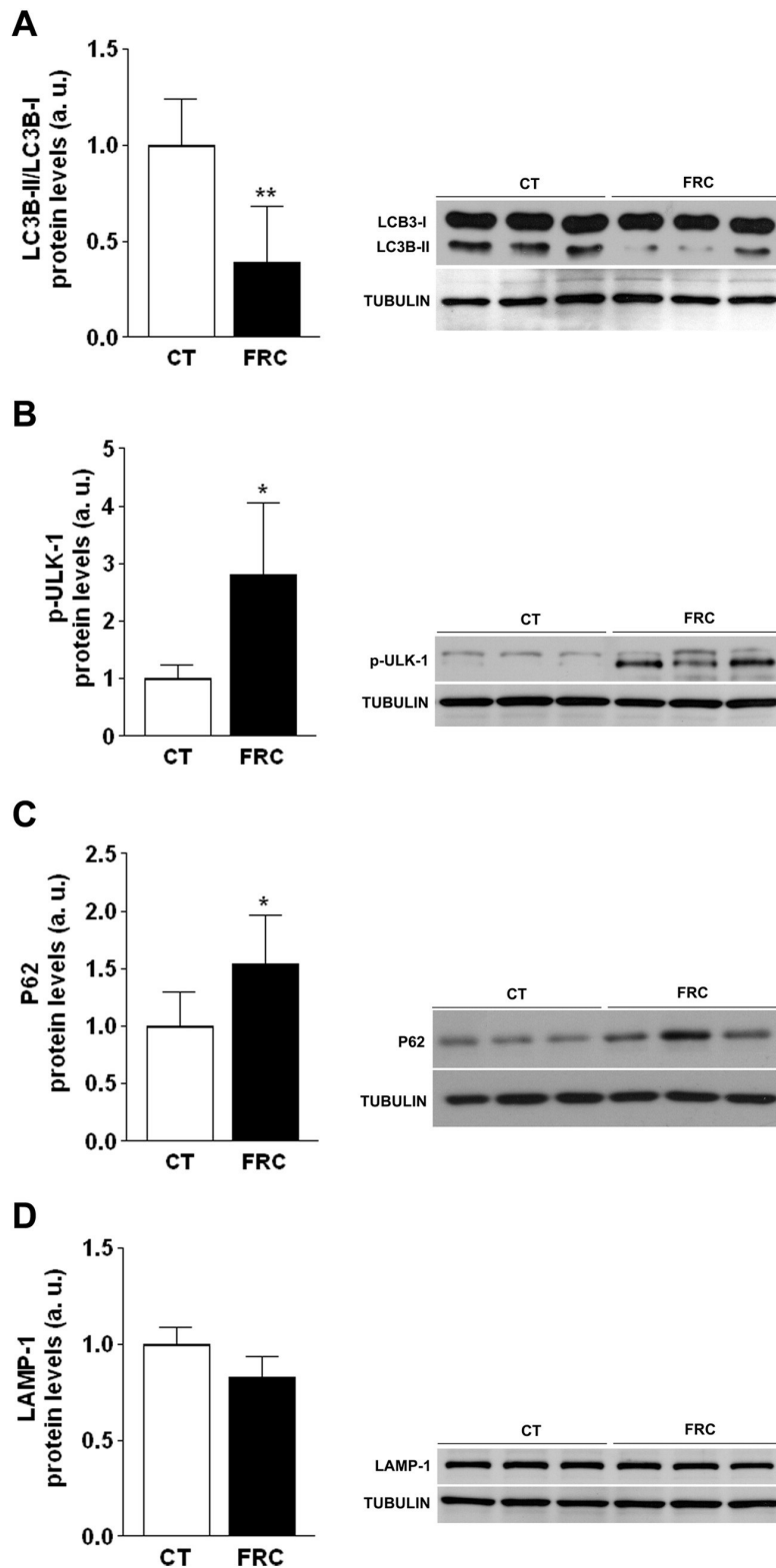
in short-term supplementation studies the mechanisms involved in these metabolic alterations depend on PPAR $\alpha$  inhibition, the effects of sub-chronic supplementation are instead related to defective hepatic autophagy. Moreover, with this longer supplementation protocol, we did not observe any signs of ER stress in the liver.

Previous reports by Ren et al. [7] showed that feeding a high fructose diet to mice caused an increase in hepatic de novo lipogenesis, which was related to the induction of ER stress. In contrast, despite presenting a similar degree of hepatic steatosis, mice fed a high fat diet showed no increase in ER stress markers, which was attributed to the fact that lipogenesis was not increased, but decreased. In the present study, although fructose supplementation increased de novo lipogenesis in rat liver (Fig. 1), most markers of ER stress were unaltered: we only detected an increase in p-IRE1 levels, but neither in the downstream effectors of this branch nor in the two other branches (PERK and ATF6) of the unfolded protein response (Fig. 5). The differences with the study by Ren et al. may be attributed to the animal model used, as fructose metabolism clearly differs in rats and mice. For example, mice are able to convert ingested fructose into glucose, whereas rats, like humans, cannot perform this conversion [9]. Therefore, as a surrogate model for humans, the rat is a better model than the mouse to study fructose metabolism.

The amount of fructose supplemented to the rodents does not seem to significantly account for the differences in ER stress response. Thus, in a study performed by Su et al. [29], rats received a similar amount of calories from fructose as in our present study (around 60%), but contrary to our results, they did observe an increase in ER stress markers. Length of treatment may be a more critical factor, as in our previous study we



**Fig. 6.** Hepatic steatosis in 8-week-fructose-supplemented rats. Histological study of liver sections from control rats and rats supplemented with 10% fructose. Livers were cryosectioned and processed for histological examination of fat infiltration by Oil Red O staining. Images are representative of liver sections from control (n = 5) and fructose-supplemented (n = 6) rats. The scatter plot shows individual values of the stained area calculated as a percentage of stained cells/total section area. The horizontal line across each group locates the median.



**Fig. 7.** Fructose inhibits autophagy in the liver through increased ULK-1 phosphorylation. (A) Protein levels of LC3B-I and LC3B-II in liver samples from control and fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. Bar plot shows the ratio between LC3B-II and LC3B-I, expressed as the mean (a. u., arbitrary units)  $\pm$  sd of the values obtained in samples from 4 control and 5 fructose-supplemented rats. Western blot of phosphorylated ULK-1 (B), p62 (C) and LAMP1 (D) proteins in samples from the livers of control and fructose-supplemented rats. Bar plots show the levels of each protein, expressed as the mean (a. u., arbitrary units)  $\pm$  sd of the values obtained in samples from 4 control and 5 fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .



observed not only IRE1 activation, but also a marked increase in the spliced form of XBP-1 mRNA and nuclear protein, suggesting hepatic ER stress in rats supplemented with fructose for 2 weeks [15]. These results, together with the decrease in PPAR $\alpha$  observed in 2-week supplemented rats, are closer to those obtained by Su et al. using a fructose supplementation period of 3 weeks [29].

Despite the lack of ER stress, our results show defective autophagy in the livers of fructose-supplemented rats. To the best of our knowledge, this is the first report showing that fructose consumption reduces liver autophagy. Although a previous report [33] showed a putative increase in autophagy markers after fructose feeding in rats, the experimental design used, including intra-uterine growth restriction, switching of litters between dams and prolonged solid fructose administration to the offspring, makes it very difficult to compare with our present results. Autophagy (also termed macroautophagy) is a homeostatic process that is triggered by several environmental cues (such as starvation or excess of nutrients), and it has recently been shown to be involved in pathological conditions, including metabolic disorders [34]. More precisely, autophagy is inhibited in response to high glucose levels through mTORC1 activation [35]. Our results show that in the livers of rats supplemented with fructose there is a marked increase in the phosphorylation of mTOR and of its downstream substrate 4E-BP1 (Fig. 3A, B). This effect can be attributed to increased phosphorylation of Tsc2 in Thr-1462 (Fig. 3C), as phosphorylation of this site suppresses the inhibitory effect of Tsc1/2 on mTORC1 [36]. The exact mechanism by which Tsc2 is phosphorylated remains to be established, as none of the kinases that we examined (p38-MAPK, Akt, ERK, AMPK and GSK3 $\beta$ ) were activated in the livers of fructose-supplemented rats (Fig. 3D, Table 2).

Independently of the upstream mechanism involved, our results show that fructose supplementation induces mTOR phosphorylation in Ser-2481, which is an autophosphorylation position considered a biomarker for intrinsic mTORC specific catalytic activity [17]. Moreover, mTOR autophosphorylation is increased together with increased transcription of genes involved in glycolysis and pentose phosphate pathways (Fig. 4A), also indicative of mTORC1 activation [17,25]. Thus, the activation of mTORC1 is probably the reason for the observed increase in the phosphorylation of ULK-1 in the livers of fructose-supplemented rats, which results in autophagy inhibition as is also shown by the reduction in the autophagic marker LC3B-II (Fig. 7A).

Defective autophagy in obese or high fat diet-fed rodents may be caused by the inhibition of autophagosome formation or through lysosomal defects/impaired fusion of lysosomes and autophagosomes [36]. Our results point to the first mechanism, as ULK1 is an important regulator of the formation of the phagophore, a pre-autophagosomal structure, and therefore ULK1 inactivation inhibits the initial phases of the autophagic pathway [33]. Moreover, we also observed reduced levels of LC3B-II, the lipidated form of LC3B-I, which is involved in a later phase (closing of the membrane to form a vesicular autophagosome) [33]. Although low levels of LC3B-II could reflect a more rapid turnover, the fact that ULK1 activity is inhibited points to a general defect in autophagy caused by fructose supplementation. Moreover, although we could not directly measure autophagic function by determining changes in LC3-II in the presence or absence of lysosomal inhibitors, we observed an increase in the levels of the autophagy substrate p62, which indicates impairment in autophagic flux [37]. In contrast, LAMP-1 levels were not significantly reduced in hepatic samples from fructose-supplemented rats, suggesting that the fusion of autophagosomes with lysosomes is not affected.

Recently, it has been found that lipids accumulated in hepatocytes as lipid droplets can be selectively degraded through autophagy, a process termed lipophagy [31]. Genetic or pharmacological inhibition of autophagy, either in vivo or in vitro, promotes triglyceride accumulation in the hepatocyte [31], while the promotion of autophagy using drugs such as rapamycin, an inhibitor of mTORC1, reduces hepatic steatosis in mice with alcoholic and non-alcoholic fatty liver [38]. Regulation is two-way, as intracellular lipid accumulation inhibits autophagy in

mice fed a high fat diet resulting in obesity and fatty liver [31,39]. In the present study, rats supplemented with fructose showed a marked increase in adiposity (Table 1) and a significant accumulation of lipids in the liver (Table 1 and Fig. 6) which could account, at least in part, for defective autophagy. Thus, we could hypothesize that a harmful cycle may be established in the livers of fructose-supplemented rats where intracellular lipid accumulation inhibits autophagy, and as a consequence lipophagy would be reduced, further increasing hepatic triglyceride and lipid droplet content. Moreover, the inhibition of fatty acid  $\beta$ -oxidation activity observed in fructose-supplemented rats (Table 2) may also in part be related to defective lipophagy, as it results in decreased free fatty acid formation from triglycerides stored in lipid droplets, and consequently in a deficit of substrates for fatty acid  $\beta$ -oxidation [40]. In addition, increased expression of GPAT, an enzyme which competes with L-CPT-I for acyl-CoAs [24], may also further reduce substrate availability for  $\beta$ -oxidation. Lastly, the inhibition of hepatic  $\beta$ -oxidation could also be related to the allosteric inhibition of the rate-limiting enzyme L-CPT-I by malonyl-CoA, due to increased ACC expression [16] (Fig. 1D).

In summary, the length of supplementation is a key factor in the metabolic disturbances induced by fructose. Thus, some of the effects that are critical in short-term studies, such as PPAR $\alpha$  inhibition or ER stress induction, are not observed after longer supplementation periods, possibly as an adaptive response of the organism to the continuous supply of the carbohydrate. However, some of the early effects still persist, notably mTOR activation. Moreover, we describe here for the first time that sub-chronic fructose supplementation, more similar to the human consumption pattern, inhibits hepatic autophagy, which could explain both  $\beta$ -oxidation inhibition and lipid liver deposition, without increasing ER stress in this organ.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2014.11.003>.

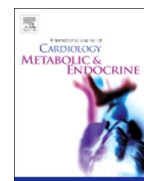
## Acknowledgments

This study was supported by grants from the Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, SAF2010-15664, SAF2013-42982-R and the European Commission FEDER funds. Miguel Baena and Gemma Sangüesa were supported by FPI and FPU grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation. We are a Consolidated Research Group of the Autonomous Government of Catalonia (SGR09-00413; SGR13-00066). We would like to thank J.C. Escolà-Gil for the analysis of lipid content in lipoprotein fractions. We also thank the University of Barcelona' Language Advisory Service for revising the manuscript.

## References

- [1] K. Park, A. Yetley, Intakes and food sources of fructose in the United States, *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (1993) 737S–747S.
- [2] L.R. Vartanian, M.B. Schwartz, K.D. Brownell, Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis, *Am. J. Public Health* 97 (2007) 667–675.
- [3] J.A. Welsh, A. Sharma, J.L. Abramson, C. Gillespie, M.B. Vos, Caloric sweetener consumption and dyslipidemia among US adults, *JAMA* 303 (2010) 1490–1497.
- [4] L.S. Gross, L. Li, E.S. Ford, S. Liu, Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 774–779.
- [5] M. Maersk, A. Belza, H. Stødkilde-jørgensen, S. Ringgaard, E. Chabanova, H. Thomsen, et al., Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-month randomized intervention study, *Am. J. Clin. Nutr.* 95 (2012) 283–289.
- [6] M.I. Goran, K. Dumke, S.G. Bouret, B. Kayser, R.W. Walker, B. Blumberg, The obesogenic effect of high fructose exposure during early development, *Nat. Rev. Endocrinol.* 9 (2013) 494–500.
- [7] L.-P. Ren, S.M.H. Chan, X.-Y. Zeng, D.R. Laybutt, T.J. Iseli, R.-Q. Sun, et al., Differing endoplasmic reticulum stress response to excess lipogenesis versus lipid oversupply in relation to hepatic steatosis and insulin resistance, *PLoS One* 7 (2012) e30816.
- [8] S.M.H. Chan, R.-Q. Sun, X.-Y. Zeng, Z.-H. Choong, H. Wang, M.J. Watt, et al., Activation of PPAR $\alpha$  ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress, *Diabetes* 62 (2013) 2095–2105.

- [9] P.A. Mayes, Intermediary metabolism of fructose, *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (1993) 754S–765S.
- [10] N. Roglans, E. Sanguino, C. Peris, M. Alegret, M. Vázquez, T. Adzet, et al., Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302 (2002) 232–239.
- [11] N. Roglans, L. Vilà, M. Farré, M. Alegret, R.M. Sánchez, M. Vázquez-Carrera, et al., Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats, *Hepatology* 45 (2007) 778–788.
- [12] L. Vilà, N. Roglans, M. Alegret, R.M. Sánchez, M. Vázquez-Carrera, J.C. Laguna, Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism, *Hepatology* 48 (2008) 1506–1516.
- [13] L. Vilà, N. Roglans, V. Perna, R.M. Sánchez, M. Vázquez-Carrera, M. Alegret, et al., Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 741–751.
- [14] L. Vilà, A. Rebollo, G.S. Adalsteisson, M. Alegret, M. Merlos, N. Roglans, et al., Reduction of liver fructokinase expression and improved hepatic inflammation and metabolism in liquid fructose-fed rats after atorvastatin treatment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 251 (2011) 32–40.
- [15] A. Rebollo, N. Roglans, M. Baena, A. Padrosa, R.M. Sánchez, M. Merlos, et al., Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats, *J. Nutr. Biochem.* 25 (2014) 250–258, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.014>.
- [16] A. Rebollo, N. Roglans, M. Baena, R.M. Sánchez, M. Merlos, M. Alegret, et al., Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1841 (2014) 514–524.
- [17] G. a Soliman, H. a Acosta-Jaquez, E. a Dunlop, B. Ekim, N.E. Maj, A.R. Tee, et al., mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 7866–7879.
- [18] P. Sengupta, The laboratory rat: relating age with human's, *Int. J. Prev. Med.* 4 (2013) 624–630.
- [19] M. Helenius, M. Hänninen, S.K. Lehtinen, a Salminen, Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF-kB transcription factor in mouse cardiac muscle, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28 (1996) 487–498.
- [20] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [21] J.C. Escolà-Gil, J. Julve, a Marzal-Casacuberta, J. Ordóñez-Llanos, F. González-Sastre, F. Blanco-Vaca, Expression of human apolipoprotein A-II in apolipoprotein E-deficient mice induces features of familial combined hyperlipidemia, *J. Lipid Res.* 41 (2000) 1328–1338.
- [22] P.B. Lazarow, Assay of peroxisomal  $\beta$ -oxidation of fatty acids, *Methods Enzymol.* 72 (1981) 315–319.
- [23] C. Cantó, Z. Gerhart-Hines, J.N. Feige, M. Lagouge, L. Noriega, J.C. Milne, et al., AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> + metabolism and SIRT1 activity, *Nature* 458 (2009) 1056–1060.
- [24] Y. Li, K. Inoki, P. Vacratsis, K.-L. Guan, The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberlin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 13663–13671.
- [25] K. Düvel, J.L. Yecies, S. Menon, P. Raman, A.I. Lipovsky, A.L. Souza, et al., Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1, *Mol. Cell* 39 (2010) 171–183.
- [26] M.N. Lee, S.H. Ha, J. Kim, A. Koh, C.S. Lee, J.H. Kim, et al., Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 3991–4001.
- [27] A. Efeyan, R. Zoncu, S. Chang, I. Gumper, H. Snitkin, R.L. Wolfson, et al., Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival, *Nature* 493 (2013) 679–683.
- [28] S.G. Kim, G.R. Hoffman, G. Pouligiannis, G.R. Buel, Y.J. Jang, K.W. Lee, et al., Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex, *Mol. Cell* 49 (2013) 172–185.
- [29] Q. Su, C. Baker, P. Christian, M. Naples, X. Tong, K. Zhang, et al., Hepatic mitochondrial and ER stress induced by defective PPAR $\alpha$  signaling in the pathogenesis of hepatic steatosis, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306 (2014) E1264–E1273.
- [30] R. Sano, J.C. Reed, *Biochimica et Biophysica Acta* ER stress-induced cell death mechanisms, *BBA Mol. Cell Res.* 1833 (2013) 3460–3470.
- [31] R. Singh, S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, et al., Autophagy regulates lipid metabolism, *Nature* 458 (2009) 1131–1135.
- [32] R.C. Russell, H.-X. Yuan, K.-L. Guan, Autophagy regulation by nutrient signaling, *Cell Res.* 24 (2014) 42–57.
- [33] M. Aijälä, E. Malo, O. Ukkola, R. Bloigu, P. Lehenkari, H. Autio-Harmainen, et al., Long-term fructose feeding changes the expression of leptin receptors and autophagy genes in the adipose tissue and liver of male rats: a possible link to elevated triglycerides, *Genes Nutr.* 8 (2013) 623–635.
- [34] A.M.K. Choi, S.W. Ryter, B. Levine, Autophagy in human health and disease, *N. Engl. J. Med.* 368 (2013) 651–662.
- [35] J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, K.-L. Guan, AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1, *Nat. Cell Biol.* 13 (2011) 132–141.
- [36] M. Shimobayashi, M.N. Hall, Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 155–162.
- [37] D.J. Klionsky, F.C. Abdalla, H. Abeliovich, R.T. Abraham, A. Acevedo-Arozena, K. Adeli, et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy, *Autophagy* 8 (2012) 445–544.
- [38] C.-W. Lin, H. Zhang, M. Li, X. Xiong, X. Chen, X. Chen, et al., Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice, *J. Hepatol.* 58 (2013) 993–999.
- [39] L. Yang, P. Li, S. Fu, E.S. Calay, G.S. Hotamisligil, Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance, *Cell Metab.* 11 (2010) 467–478.
- [40] K. Liu, M.J. Czaja, Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy, *Cell Death Differ.* 20 (2013) 3–11.



## Liquid fructose supplementation in LDL-R<sup>-/-</sup> mice fed a western-type diet enhances lipid burden and atherosclerosis despite identical calorie consumption☆☆☆



Natalia Hutter<sup>a,1,2</sup>, Miguel Baena<sup>a,b,1,2</sup>, Gemma Sangüesa<sup>a,b,2</sup>, Alberto Dávalos<sup>f,2</sup>, María Jesús Latasa<sup>f,2</sup>, Joan Carles Escolà-Gil<sup>d,e,2</sup>, Rosa María Sánchez<sup>a,b,c,2</sup>, Núria Roglans<sup>a,b,c,2</sup>, Marta Alegret<sup>a,b,c,2</sup>, Juan Carlos Laguna<sup>a,b,c,\*,2</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Institute of Biomedicine, University of Barcelona, Spain

<sup>c</sup> CIBEROBn, Spain

<sup>d</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Autonomous University of Barcelona and IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> CIBERDEM, Spain

<sup>f</sup> IMDEA Food, CEI UAM + CSIC, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 June 2015

Received in revised form 9 September 2015

Accepted 6 October 2015

Available online xxxx

#### Keywords:

Sugar-sweetened beverages

CVD

Lipid metabolism

Macrophages

NAFLD

Inflammation

### ABSTRACT

**Background:** Studies on humans have related the high consumption of fructose, especially in the form of sugar-sweetened beverages, to obesity, fatty liver, and hypercholesterolemia, all risk factors for atherosclerosis and cardiovascular disease. We aimed to determine whether supplementation of liquid fructose (SLF), in either a normal, healthy chow or a Western-style chow, promoted the appearance of atherosclerosis in a rodent model. **Methods:** LDL receptor knockout mice were fed for twelve weeks with normal chow, normal chow plus *ad libitum* 15% fructose solution, Western chow, or Western chow plus *ad libitum* 15% fructose solution (W + F). Food and liquid intake and body weight were periodically monitored. At the end of the study, plasma and hepatic lipids, liver histology and expression of genes related to lipid handling were analyzed and histological and immunohistological analyses of atherosclerosis at the aortic origin was performed.

**Results:** Total calorie intake was significantly increased in Western-fed vs normal chow-fed mice, but was not modified by SLF. SLF significantly increased body weight, visceral adiposity, plasma lipids and liver cholesterol content in Western-fed mice, probably due to an increase in *de novo* lipid synthesis. Aortic atherosclerotic total lesion area was significantly correlated to plasma lipids, being highest in W + F mice. Further, SLF induced higher immunostaining for macrophages and oxidized-LDL receptor, independently of lesion area and caloric burden.

**Conclusions:** SLF, without changing total calorie intake, increases atherosclerosis, visceral adipose tissue and cholesterol burden in a background of overweight LDL receptor knockout mice consuming an unhealthy, Western-type solid rodent chow.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ireland Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

A sedentary lifestyle and unhealthy dietary habits are fueling the epidemic of metabolic diseases, such as type 2 diabetes and obesity, and the associated cardiovascular diseases related to atherosclerosis [1]. One of the most prevalent dietary changes over recent decades has been the increasing consumption of simple sugars, mainly in the form of sweetened beverages, especially among low income populations all over the world [2]. Together with glucose, fructose in the form of sucrose or high fructose corn syrup (HFCS) is one of the main sweeteners used in the production of sodas and baked foods. Numerous studies in recent years have related the high consumption of fructose or simple sugars to ectopic fat deposition [3], hypercholesterolemia [4], and

☆ This work was supported by grants from the Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, the Ministry of Economy and Competition [SAF2013-42982-R, FIS P111/00315] and European Commission FEDER [SAF2013-42982-R] funds. Miguel Baena and Gemma Sangüesa were supported by FPI and FPU grants, respectively, from the Spanish Ministry of Science and Innovation. We are a Consolidated Research Group of the Autonomous Government of Catalonia [SGR09-00413; SGR13-00066].

☆☆ No potential conflict of interest, including related consultancies, shareholdings and funding grants.

\* Corresponding author at: Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Joan XXIII s.n., Barcelona 08028, Spain.

E-mail address: [jlacuna@ub.edu](mailto:jlacuna@ub.edu) (J.C. Laguna).

<sup>1</sup> Natalia Hutter and Miguel Baena contributed equally to this work.

<sup>2</sup> These authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

diabetes [5] in humans. As a consequence, the high consumption of fructose or simple sugars, especially in the form of sugar-sweetened beverages, has also been related to cardiovascular disease and mortality [6,7,8].

Due to metabolic similarities, the rat is a good model for studying changes induced by fructose consumption in humans [9]. Fructose supplementation of rats' drinking water (10% weight/volume), provides a pattern of fructose consumption similar to that of the upper quintile of human populations consuming high quantities of sugar-sweetened beverages [10]. In previous studies, the use of this model enabled us to demonstrate that fructose, but not glucose, induces hypertriglyceridemia and fatty liver by simultaneously increasing liver fatty acid synthesis and reducing liver fatty acid oxidation [11,12]. Moreover, at least in female Sprague–Dawley rats, metabolic changes are accompanied by alterations in liver glucose handling, with a marked reduction in insulin receptor substrate-2 and silent regulator of translation-1 expression and activity [13,14]. These fructose-induced metabolic alterations observed in rat are well known risk factors for the development of atherosclerosis and related cardiovascular diseases in humans.

Consequently, we studied the influence of liquid fructose ingestion in atherogenesis. As rats are resistant to atherosclerosis, we studied the effect of liquid fructose supplementation in a murine model of dietary-induced atherosclerosis, LDL receptor-deficient ( $LDLR^{-/-}$ ) mice [15]. We used two different solid dietary substrates, a standard "healthy" rodent chow and an "unhealthy", Western-type rodent chow rich in saturated fat, refined carbohydrates and cholesterol. Supplementation of liquid fructose in  $LDLR^{-/-}$  mice fed a standard rodent show induced a non significant increase in plasma lipid and liver cholesterol content, but failed to significantly increase atherosclerosis. However, liquid fructose supplementation significantly increased atherosclerosis and liver and plasma lipid content in  $LDLR^{-/-}$  mice fed Western-type diet, despite ingesting exactly the same amount of calories as  $LDLR^{-/-}$  mice on Western-type diet only.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and experimental design

Male  $LDLR^{-/-}$  mice (C57BL/6 N) were purchased from Charles River (France) and maintained with water and food *ad libitum* at constant humidity and temperature with a light/dark cycle of 12 h. After three weeks of acclimatizing, animals were randomly separated into four groups of 10 mice each which received: 1. control rodent diet without supplementary sugar: control group (C); 2. control rodent diet supplemented with 15% weight/volume fructose in drinking water: fructose-supplemented group (F); 3. Western-type diet without supplementary sugar: Western group (W); 4. Western-type diet supplemented with 15% weight/volume fructose in drinking water: Western plus fructose group (W + F). The composition of control (2018 Teklad Global 18% protein, Harlan Laboratories) and Western-type (D12079B Open Source Diets, Research Diets, Inc.) diets is detailed in Table 1.

During a feeding period of 12 weeks, consumed food and beverage were measured every two days and body weight once a week. At the end of the study, animals were sacrificed under intraperitoneal

ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/Kg) anesthesia between 9 and 10 a.m. after being fasted for 2 h. All procedures were conducted in accordance with the guidelines established by the University of Barcelona's Bioethics Committee, as stated in Law 5/1995 (21st July) from the Generalitat de Catalunya. These guidelines follow the Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.

### 2.2. Sample preparation

Blood samples were obtained by intracardiac puncture at the time of death and collected in micro tubes containing anticoagulant as additive (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany). Plasma was obtained by centrifugation and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. Liver tissue was excised and fractionated. 10–100 mg were immediately frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used for total RNA extraction. Another portion for hepatic histological analysis was obtained. An additional section of liver tissue (100 mg) was perfused and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for quantifying liver lipids content. The upper atrial portions of hearts, including the aortic valve, were excised and used for histological analysis, as described below.

### 2.3. Leptin and lipid analysis

Plasma leptin and lipid levels were determined at the end of treatment. Plasma leptin levels were determined with the RL83K RIA kit from Linco Research (St. Charles, MO). Plasma triglycerides levels were measured by Accutrend® Plus System glucometer (Cobas, Roche Farma, Barcelona, Spain) using a specific test strips. Plasma cholesterol was determined by Cholesterol CHOD-POD colorimetric test from Spinreact (Girona, Spain).

Liver lipids were extracted according to Bligh & Dyer [16] method using the homogenate fraction. The lipid extract was evaporated under a stream of nitrogen gas and dissolved in absolute ethanol. Triglycerides, total and free cholesterol contents in liver were determined by using colorimetric tests: Triglycerides-LQ n° 41,030, Cholesterol CHOD-POD n° 1,001,091 and Free-Cholesterol-LQ n° 41,035 from Spinreact (Girona, Spain), respectively.

Size fractionation of plasma lipoproteins was performed by fast performance liquid chromatography (FPLC) of pooled filtered plasma samples using a Superose 6® column as previously described [17]. In each fraction, total cholesterol and triglyceride content was assayed.

### 2.4. RNA isolation and quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from 60 mg of liver tissue using Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen™, Thermo-Fisher Scientific Inc., MA, USA), in accordance with the manufacturer's guidelines. Single stranded cDNA was synthesized by mixing 1 µg of liver total RNA, 125 ng of random hexamers (Roche Farma, SA, Madrid, Spain,) as primers in the presence of 5 × First-Strand Buffer, 10 mM dithiothreitol (DTT), 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT), 20 units of RNase OUT from Invitrogen™ and 0.5 mM of each dNTP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a total volume of 20 µl. Samples were incubated at 37 °C for 60 min in MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

The PCR reaction was carried out in StepOnePlus™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). 20 µl of reaction mixture contained: Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 100 nM of each specific primer (including forward and reverse primers) and 10 ng of cDNA for each gene. After an initial denaturation at 95 °C for 10 min, 40 cycles of amplification were done. PCR reactions were performed in duplicate and normalized to a housekeeping gene, the TATA box binding protein (*tbp*) gene, using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method. The GenBank™ number, primer sequences and PCR product length are listed in Supplemental Table 1.

**Table 1**  
Composition of experimental diets.

	Control diet	Western-type diet
Kcal/g	3.1	4.7
Protein	18.6%	20%
Carbohydrates	60%	54%
Sucrose	0%	34%
Insoluble fiber	14.7%	5%
Lipids	6.2%*	21%**
cholesterol	0%	0.21%

\* Mainly unsaturated fat.

\*\* 20% saturated fat from milk plus 1% corn oil.

### 2.5. miRNA determination

Total RNA, including small RNAs, was isolated using the miRNeasy minikit in accordance with the manufacturer's protocol. For miRNA quantification, miRNAs were reverse-transcribed using miScript II reverse transcription kit. Specific primers for each miRNA were used and real time PCR was performed using the miScript SYBR Green PCR kit on a 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). All reagents and kits used were from Qiagen (Las Matas, Madrid, Spain).

Relative expression of miRNAs was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using RNU6 for normalization. Only validated miRNAs for the target genes were analyzed. Selection of validated miRNAs was assessed using the MirWalk 3 [18] and miRTarbase 4 [19] databases.

### 2.6. Histological analysis

For hepatic histological analysis of Oil-Red O stained sections, the liver tissue was perfused and fixed in 10% paraformaldehyde solution before processing for paraffin embedding. Images were acquired with an Olympus BX71 microscope equipped with a DP72 camera and analyzed by a registered pathologist at BioBanc (Banc de tumors–IDIBAPS, Barcelona Spain), who was unaware of the treatment groups. The area of positive staining for Oil-Red O was calculated as a percentage of stained cells/total section area in each sample.

For heart histological analysis, the upper portion of the heart was excised, and placed in cryomolds (Cryomold Biopsy – Tissue Tek from Sakura Finetek Europe B.V., Netherlands) preserved in Tissue-Tek O.T.C. embedding medium, followed by freezing in dry ice-cooled isopentane. Eight micrometer serial sections of heart segments obtained in a cryostat (Leyca® CM-1900) at  $-24^{\circ}\text{C}$ , were prepared and stained with Oil-Red O and Hematoxylin-Eosin stain for histological evaluation of cardiac structures. Lesion area was quantified following the standard procedure by using *Image-J* software.

### 2.7. Immunohistochemistry studies

The immunohistochemistry analysis was performed basically as previously described by Zhang and Ramos [20]. Serial frozen sections of heart were examined for macrophage infiltration, inflammation and oxidative stress using immunohistochemistry stain with several monoclonal antibodies: F4/80 (Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Germany; reference product: sc-377,009), LOX1, p-NF $\kappa$ B-P65, RAGE (AbCam, Bristol, UK; reference product: Ab60178, Ab131109, Ab3611, respectively) and Anti-rabbit Alexa Fluor 594 (reference: A11012 from Invitrogen, Life Technologies) used as a secondary antibody.

The slides were thawed at room temperature for 2 h, and fixed with acetone for 10 min. After 30 min of treatment with the blocking solution (1% gelatin in PBS solution), tissue sections were incubated at room temperature with primary antibody (dilution 1:1000) for 1 h. Slides were washed with PBS twice and incubated with antirabbit Alexafluor 594 secondary antibody for 1 h. After two washes with PBS, 20  $\mu\text{l}$  of Fluoromount-G (e-Bioscience, San Diego, CA, USA) were added to the slides and covered. The images of the tissue sections were recorded using a fluorescence microscope and their color intensity was measured by *Photoshop* (Adobe Photoshop 7.0 software).

### 2.8. Statistical methods

Results are expressed as the mean of  $n$  values  $\pm$  standard deviation. Plasma and lipid samples were assayed in duplicate. Significant differences between values from control, fructose and western groups were established by the one-way ANOVA test and Bonferroni post-test for selected comparisons; significant differences between values from western and western + fructose group were established by the unpaired t-test (GraphPad Software V5). When the number of samples was too small or variance was not homogeneous, a non-parametric

test was performed. The level of statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Liquid fructose supplementation in solid diet increases plasma lipids in $LDLR^{-/-}$ mice

Zoometric parameters and plasma cholesterol, triglyceride and leptin concentrations are shown in Table 2.  $LDLR^{-/-}$  mice fed a solid Western-type diet showed an increased body weight during and at the end of treatment ( $\times 1.11$  and  $\times 1.24$  fold, respectively, vs Control (C) group). Although both the C and Western (W) groups of mice consumed equal amounts of solid diet, the high energy density of the Western diet yielded a  $\times 1.49$  fold increase in the amount of energy consumed by W mice. Furthermore, W mice showed increased concentrations of plasma cholesterol ( $\times 2.62$  fold), triglyceride ( $\times 2.92$  fold) and leptin ( $\times 3.56$  fold) vs C animals. Liquid fructose supplementation in standard (F) or western (W + F) solid diet-fed animals increased concentration of plasma cholesterol ( $\times 1.41$  and  $\times 1.73$  fold vs C and W groups, respectively) and triglyceride ( $\times 1.31$  and  $\times 1.39$  fold vs C and W groups, respectively), although only W + F samples achieved statistical significance. Fast protein liquid chromatography (FPLC) analysis (Fig. 1) indicated that triglycerides were transported in triglyceride-rich lipoproteins (chylomicrons and VLDL), while cholesterol shifted progressively from HDL and LDL (C samples) to triglyceride-rich lipoproteins (W and W + F samples). W + F mice showed an increased body weight during and at the time of sacrifice ( $\times 1.11$  and  $\times 1.19$  fold vs W, respectively), mainly due to an increased percentage of visceral fat ( $\times 2.03$  fold vs W). These fructose-induced changes in W + F mice were apparent without significant changes in the total amount of energy consumed, due to a compensatory reduction in the amount of ingested solid food ( $\times 0.83$  fold vs W), together with a reduction in the ingested volume of fructose solution ( $\times 0.77$  fold vs W).

### 3.2. Liquid fructose supplementation in $LDLR^{-/-}$ mice alters hepatic cholesterol homeostasis independently of the type of solid diet consumed

Histological analysis of Oil-Red O (ORO) liver sections showed no differences among the different dietary groups in the percentage of steatotic liver cells, which was always higher than 85–90% (Fig. 2A). Only livers from the W + F group had micro- and macrovesicular steatosis in all samples studied. Accordingly, liver triglyceride content was unchanged in F and W groups with respect to C values, while livers from W + F animals showed a  $\times 1.55$  fold increase in triglyceride content vs W animals (Fig. 2B). In contrast, there was a progressive increase of total cholesterol content in liver among all dietary interventions ( $\times 1.22$  and  $\times 2.54$  fold vs C for F and W groups respectively), which was further increased by the addition of fructose to the Western diet ( $\times 1.72$  fold W + F vs W). This change was mainly observed in the cholesteryl-ester fraction, which was almost absent in the control group and followed a similar pattern to that of total cholesterol (Fig. 2B).

We analyzed the liver expression of genes related to fatty acid and cholesterol synthesis and metabolism (Fig. 2C). The Western diet did not change the mRNA levels of genes related to fatty acid synthesis (fatty acid synthase *fas*, stearoyl-CoA desaturase 1 *scd1*, and liver pyruvate kinase *l-pk*), with respect to control animals, but it did increase the mRNA levels of genes related to fatty acid oxidation (liver carnitine palmitoyltransferase 1 *lcpt-1* and peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  *ppar\alpha*), as well as reducing those related to cholesterol synthesis (hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A reductase *hmgcrd*), and increasing the expression of genes related to lipoprotein uptake (scavenger receptor-class B1 *sr-b1*, low density receptor related protein 1 *lrp1*, scavenger receptor-class A1 *sr-a1*, and cluster of differentiation 36 *cd36*). Fructose supplementation in both control and western diets had the opposite effect, increasing liver mRNA levels of fatty acid and

**Table 2**  
Zoometric parameters and plasma analytes of LDLR<sup>-/-</sup> mice exposed to four different dietary regimes for 84 days.

Parameters	C	F	W	W + F
Final body weight (g)	26.6 ± 2.4	26.5 ± 4.9	33.0 ± 5.8##	39.2 ± 2.7*
Liver weight (g)	1.38 ± 0.31	1.37 ± 0.19	1.60 ± 0.27	2.35 ± 0.85**
% Liver/body weight	4.9 ± 0.4	5.3 ± 0.9	4.9 ± 0.6	6.1 ± 1.2
VAT weight (g)	0.88 ± 0.38	1.08 ± 0.36	1.60 ± 1.02	3.25 ± 0.39**
% VAT/body weight	3.1 ± 1.1	3.7 ± 1.0	4.2 ± 2.3	8.0 ± 0.6*
AUC weight (g/[animal × 84 days])	161 ± 12	160 ± 17	179 ± 21#	199 ± 16*
AUC solid food intake (g/[animal × 84 days]) <sup>a</sup>	271 ± 4	180 ± 18 <sup>†</sup>	266 ± 37	221 ± 1
AUC liquid intake (ml/[animal × 84 days]) <sup>a</sup>	448 ± 26	646 ± 60 <sup>†</sup>	477 ± 6	369 ± 12 <sup>†</sup>
Ingested solid kcal (animal × 84 days) <sup>a</sup>	840 ± 13	558 ± 56	1252 ± 176#	1041 ± 3
Ingested liquid kcal (animal × 84 days) <sup>a</sup>	0	388 ± 36	0	221 ± 7
Total ingested kcal (animal × 84 days) <sup>a</sup>	840 ± 13	946 ± 20	1252 ± 176#	1262 ± 11
Plasma cholesterol (mg/dL)	291 ± 14	410 ± 98	772 ± 272##	1337 ± 312*
Plasma triglycerides (mg/dL)	116 ± 16	151 ± 30	339 ± 146##	473 ± 86*
Plasma leptin (ng/mL)	4.8 ± 2.4	5.5 ± 2.9	17.1 ± 5.0##	20.5 ± 3.3

C: Standard solid-chow; F: Standard solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*; W: Western solid-chow; W + F: Western solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*; VAT: Visceral Adipose Tissue; AUC: Area Under the Curve. Values are expressed as mean ± SD of 5–10 animals, except for Parameters, which were obtained from two cages containing at least 4 animals each.

<sup>a</sup> Parameters which were obtained from two cages containing at least 4 animals each.

#  $P < 0.05$  vs C.

##  $P < 0.01$  vs C.

\*  $P = 0.09$  – marginally significant – vs W.

†  $P < 0.05$  vs W.

\*\*  $P < 0.01$  vs W.

cholesterol synthesis (*hmgcrd*) genes, while in general reducing the mRNA levels of fatty acid oxidation and lipoprotein uptake genes, with the exception of the *cd36* gene, in which mRNA levels were increased by fructose supplementation, especially in the W + F group ( $\times 3.09$  fold vs W). The mRNA level of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), a nuclear receptor involved in the control of CD36 [21], was also significantly increased in livers of W + F rats ( $\times 2.95$  fold vs W).

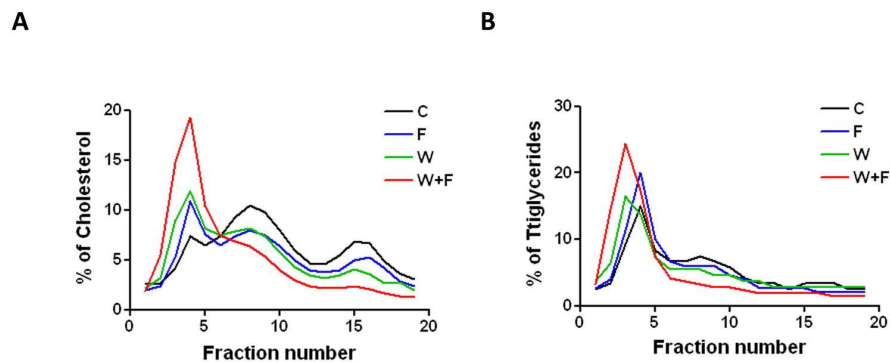
To find a possible mechanism which explained the increased expression of the *hmgcrd* gene by fructose, we assessed the expression of several micro-RNAs that have been reported to control cholesterol synthesis [22] (Fig. 3). We only detected a clear significant increase in the expression of miR-185-5p and miR-342-5p in the groups of mice receiving a Western-type solid diet. Fructose supplementation in Western diet decreased the expression of miR-122-3p.

### 3.3. Liquid fructose supplementation in LDLR<sup>-/-</sup> mice promotes macrophage infiltration in aortic atherosclerosis plaques independently of lipid deposition

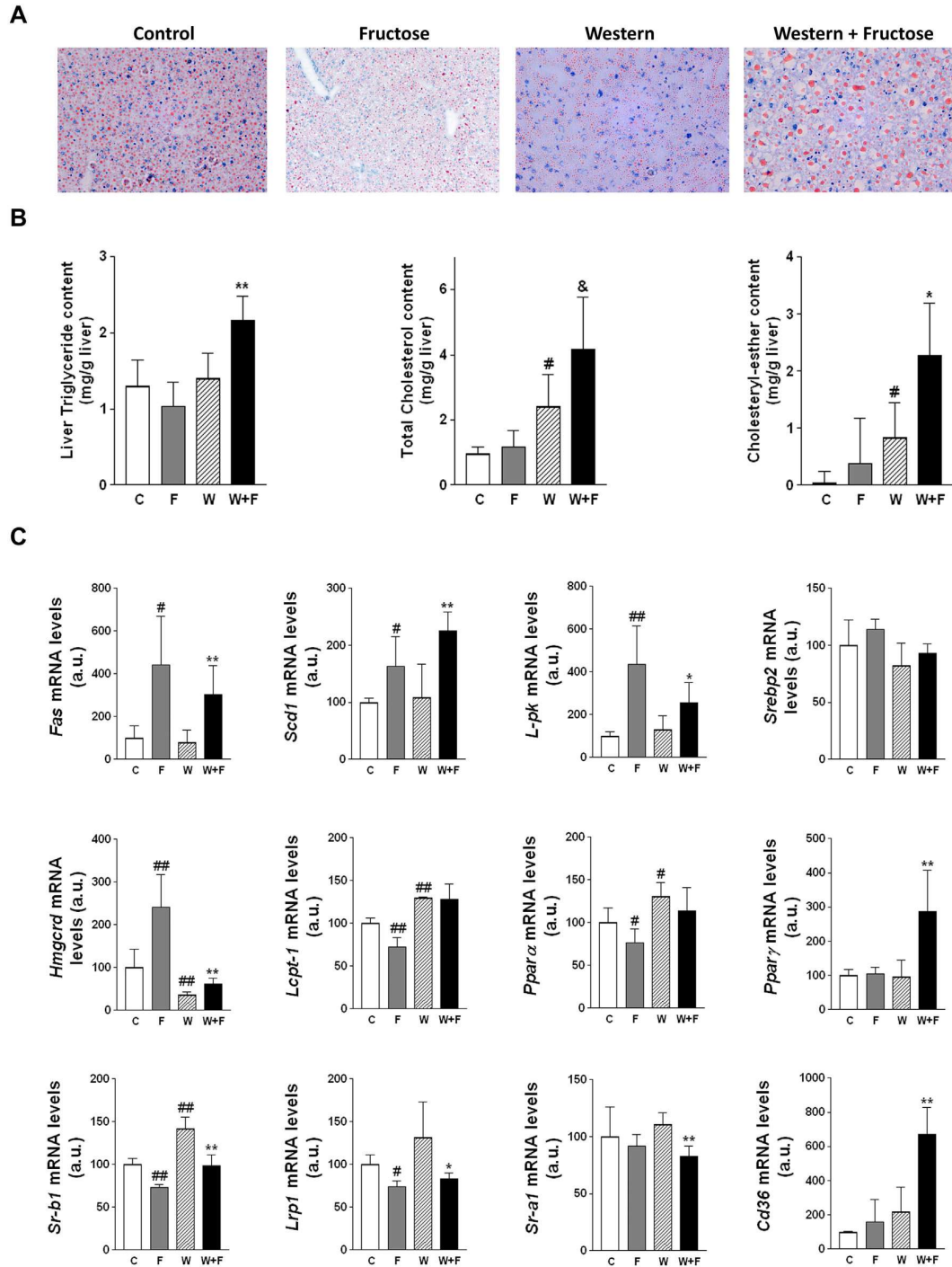
To assess the extent of atherosclerosis we determined the lesion percent area in five sequential cross-sections through the heart and aortic origin; quantification of the lesion percent area showed a significant increase in W samples from sections 1 to 5, while Fructose supplementation significantly increased lesion percent area in sections 4 and 5

from W + F animals *versus* W (Fig. 4A). For each of the dietary groups, representative ORO-Hematoxylin-Eosin images of Section 3, corresponding to the aortic valve leaflets, are shown in Fig. 4B; Section 3 was chosen because lesions were visible beneath all three valve leaflets. Quantification of the total lesion area as AUC of lesion areas from section 1 to 5, as shown in Fig. 4C, demonstrated a significant increase in W group ( $\times 8.1$  fold vs C), that was further increased in W + F ( $\times 2.6$  vs W). Total lesion area closely followed the progressive increase in plasma lipids from F through W and W + F mice, presenting a direct and significant correlation with total plasma cholesterol ( $r^2 = 0.824$ ,  $P < 0.0001$ ) and triglycerides ( $r^2 = 0.697$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 4D). Nevertheless, the increased atheromatous lesion did not result in stimulation of nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) mediated inflammation in the vessel wall, as immunodetection of phospho-p65, a marker of NF $\kappa$ B activation, indicated that this parameter was not modified in samples from aortic sections 1 to 5 obtained from the different dietary groups (Fig. 5A).

Again using immunohistochemistry, we detected the presence of macrophages in the lesion area. Macrophage infiltration, detected by specific F4/80 immunohistochemistry (Fig. 5B), did not follow the pattern of increased lesion area, being significantly increased practically in all the aortic sections studied from F group; the W + F group showed a similar pattern, but due to high sample variability statistical significance vs W group was only achieved in section 4. A similar behavior



**Fig. 1.** Percent distribution of total cholesterol (A) and triglycerides (B) among the different FPLC fractions of pooled filtered plasma samples from C (mice fed standard solid-chow), F (mice fed standard solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*), W (mice fed Western solid-chow), and W + F (mice fed Western solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*). Each fraction was analyzed in duplicate.

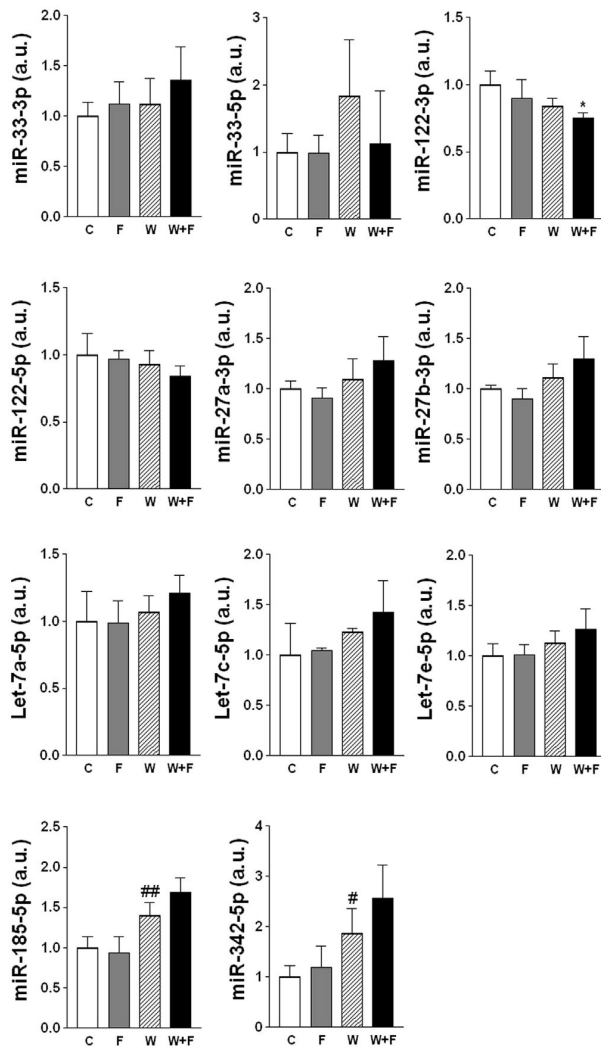


**Fig. 2.** A. Histological study of liver sections from Control C (mice fed standard solid-chow), Fructose F (mice fed standard solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*), Western W (mice fed Western solid-chow), and Western + Fructose W + F (mice fed Western solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*). Livers were cryosectioned and processed for histological examination of fat infiltration by Oil-Red O staining. A representative image of liver sections from each experimental group is shown. B. Bar plots showing the liver content of different lipid species from the four experimental dietary groups of mice (mean  $\pm$  sd of five different liver samples). C. Bar plots showing the relative levels of specific mRNAs from the four experimental dietary groups of mice (mean  $\pm$  sd of five different liver samples). # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs C values; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs W values.

was observed for the modified lipoprotein receptor oxidized-LDL receptor 1 (LOX1) (Fig. 6A). In the case of another modified receptor studied, the receptor for advanced glycation end products (RAGE), the high dispersion of the immunohistochemical data precluded the validation of any significant change (Fig. 6B).

#### 4. Discussion

A significant relationship between higher sugar consumption and increased risk for cardiovascular disease (CVD) mortality has been found in humans, and the association remains significant after adjusting



**Fig. 3.** Bar plots showing the relative levels of specific miRNAs, as mean  $\pm$  sd, in four different liver samples obtained from C (mice fed standard solid-chow), F (mice fed standard solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*), W (mice fed Western solid-chow), and W + F (mice fed Western solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*). \* $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs C values; # $P < 0.05$  vs W values.

for CVD risk factors [8]. Moreover, although higher sugar intake can be a marker of unhealthy dietary habits, the association is not explained by overall diet quality, and it is also consistently observed in the specific case of sugar-sweetened beverage consumption [8]. As previously reported by Malik et al. [23], one of the proposed causes of this association is fructose, found in similar amounts in sucrose and HFCS. Thus, epidemiological studies indicate that added fructose may increase blood pressure and blood pressure variability, enhance heart rate and myocardial oxygen demand, and contribute to insulin resistance and general metabolic dysfunction in humans (for detailed information see reviews [24,25]). In the present study, we found that at an identical calorie consumption, fructose supplementation in liquid form, besides increasing body weight and visceral adiposity, promoted atherosclerosis in LDL receptor (LDLR)<sup>-/-</sup> mice fed an unhealthy, Western-type solid chow. This latter effect was directly related to the increase in plasma lipid levels induced by fructose supplementation. Moreover, the addition of liquid fructose to a solid diet significantly increased the expression of a macrophage marker and a modified lipoprotein receptor

in atherosclerotic plaques, independently of the extension of the lesion area and the type of solid diet consumed.

Among the experimental models available for the study of atherosclerosis, non-human primates and rabbits develop atherosclerosis lesions that are more or less similar to those in humans in response to a cholesterol-enriched diet [26]. Besides ethical concerns, non-human primates are both expensive and difficult to house and handle, while rabbits present a disproportionate response to dietary cholesterol. There are few published reports about the effect of fructose supplementation on the development of atherosclerosis in these species. Suzuki et al. [27,28] reported an accumulation of aortic foam cells and infiltrated macrophages after feeding cynomolgus monkeys with a solid diet containing 1% cholesterol and a high proportion of fructose (31%). Akira et al. [29] detected an increase in aortic intimal thickening after feeding a solid diet (1% cholesterol) supplemented with liquid fructose (10% w/v) to rabbits for 8 weeks. Unfortunately, the effect of the cholesterol-rich solid diet alone was not reported in either case.

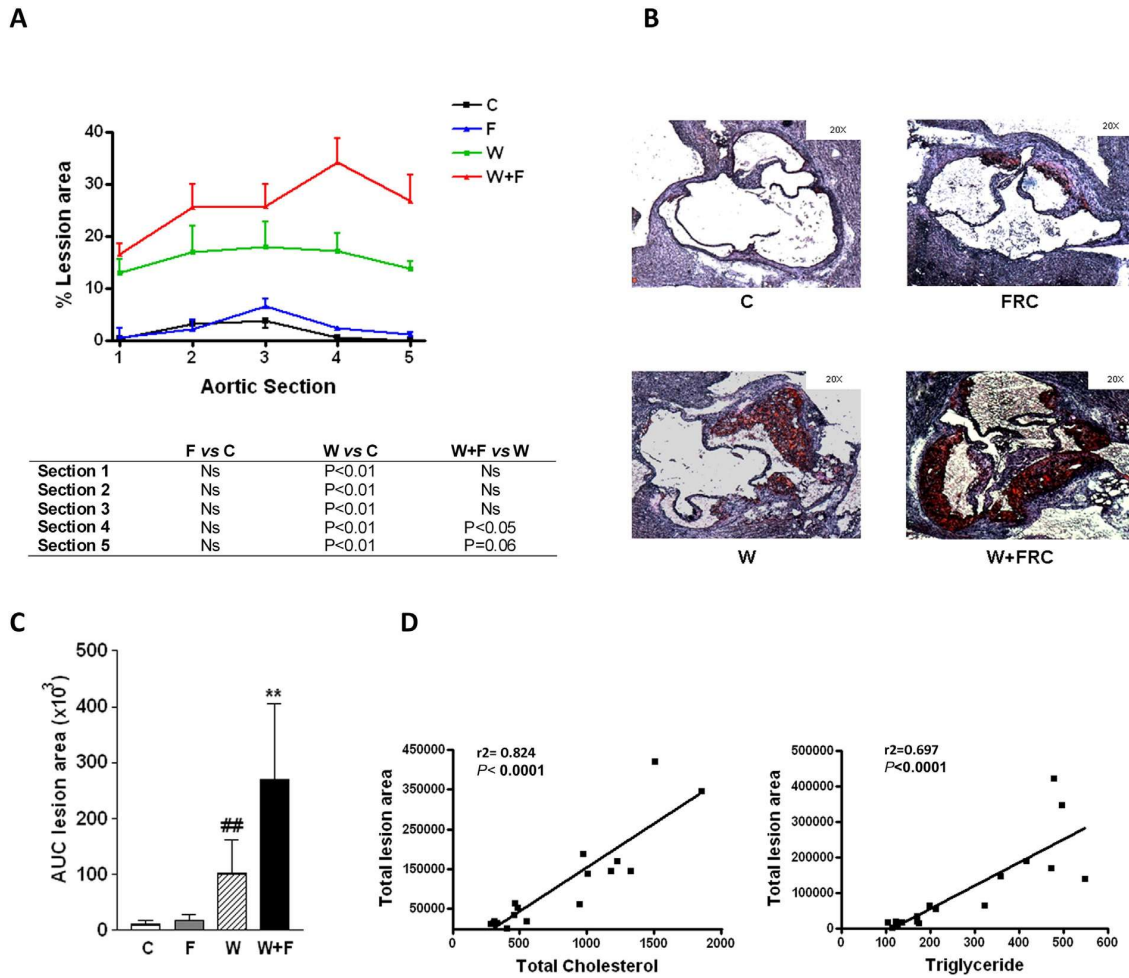
Genetically modified rodents are a valid alternative for the study of atherosclerosis [30]. In the two most used models, Apo E<sup>-/-</sup> and LDLR<sup>-/-</sup> mice, the former develops spontaneous aortic lesions when fed normal chow, while the latter develops atherosclerosis only when fed a Western-type diet, reproducing the pattern of dietary effects observed in humans. Cannizzo et al. [31] demonstrated enlarged atherosclerotic lesions in aortic and carotid arteries after feeding Apo E<sup>-/-</sup> mice on normal chow supplemented with liquid fructose (10% w/v) for 8 weeks. Merat et al. [32] reported an increase in atherosclerosis burden after feeding the more diet-sensitive model, the LDLR<sup>-/-</sup> mouse, for 5.5 months on a fructose-enriched diet that provided a very unphysiological proportion of energy (61%) from fructose.

To ascertain if the effect of liquid-fructose supplementation on atherosclerosis was different depending on the type of basal dietary substrate, we fed LDLR<sup>-/-</sup> mice on two different solid diets, a normal, “healthy” mouse chow, and an “unhealthy” mouse diet Western-style, enriched in saturated fat, simple carbohydrates and cholesterol, supplemented or not with a solution of fructose 15% weight/volume. Mice were fed on these diets for twelve weeks, a period sufficient to induce detectable atherosclerosis [15].

#### 4.1. Impact of fructose supplementation on lipid-related parameters

After this feeding period, fructose supplemented mice had consumed an amount of calories from liquid-fructose in the range of the upper quintiles of human consumption (17 and 41% of total energy in W + F and F group, respectively). Nonetheless, the amount of total consumed calories was not significantly increased in both fructose-supplemented groups versus their corresponding controls. This finding enabled us to discriminate fructose-derived effects from those driven by a huge increase in the total intake of ingested calories, as in the case between C and W animals (1252 vs 840 kcal for W and C, respectively). Of note, while mice on Western diet significantly weighted more than controls ( $\times 1.24$  fold) at the end of the study, as could be expected from the increase in the total amount of calories ingested ( $\times 1.49$  fold vs C), fructose-supplementation in Western-type fed mice also significantly increased body weight ( $\times 1.19$  fold vs W), despite both groups of mice consuming identical amount of calories. It must be pointed out that animals adjusted their calorie intake through the length of the study spontaneously. Leptin is a key adipocytokine controlling long term energy intake, whose plasma values are directly related to body weight [33]. Plasma leptin concentration and body weight were unchanged after fructose supplementation in LDL receptor (LDLR)<sup>-/-</sup> mice fed control chow, while they were increased in Western-type fed vs control mice. Further, although the difference in plasma leptin between W + F vs W values did not reach statistical significance, it increased exactly in the same proportion as the change in final body weight between both groups of animals ( $\times 1.2$  fold W + F vs W, see Table 2). Thus, it can be assumed that, at least under the same solid





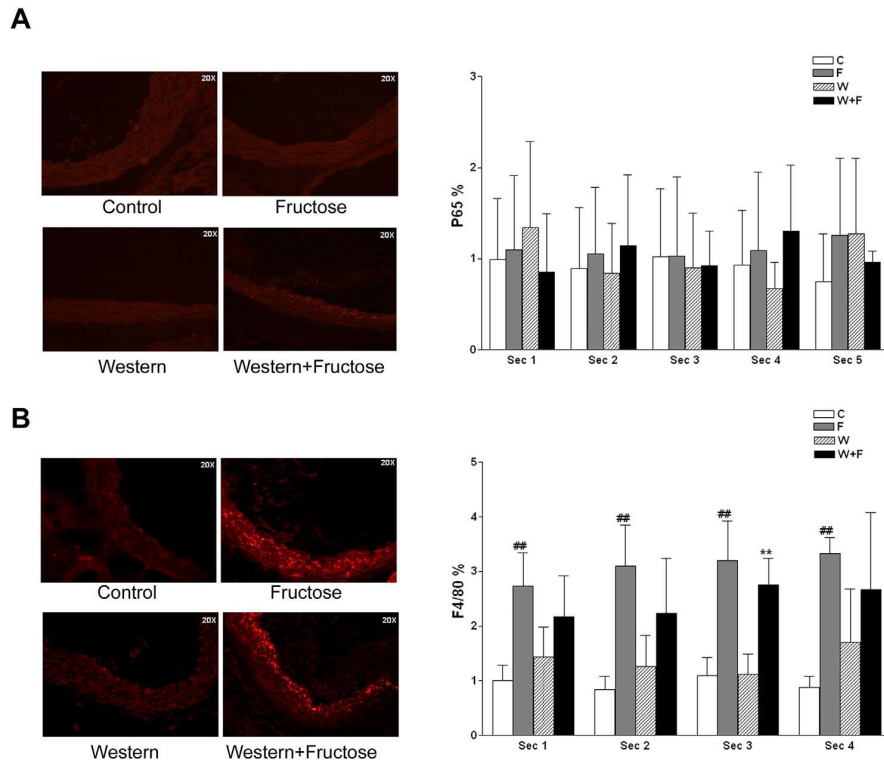
**Fig. 4.** A. Representative plot showing lesion percent area (mean  $\pm$  sd of 3–5 different heart samples) in five sequential cross-sections through the heart and aortic origin stained with Oil-Red O and Hematoxylin-Eosin of samples obtained from C (mice fed standard solid-chow), F (mice fed standard solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*), W (mice fed Western solid-chow), and W + F (mice fed Western solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*). The table below Fig. 4A shows the statistical significance for each comparison. For each of the dietary groups studied, representative images corresponding to the aortic valve leaflets (Section 3), are shown (B). C. Bar plot showing the total lesion area (mean  $\pm$  sd of 4–5 mice) of the AUC from section 1 to 5 from the four experimental dietary groups of mice. D. Correlation plots between total lesion area and either total cholesterol or triglyceride concentrations in plasma samples from the four dietary groups of mice studied. ## $P < 0.01$  vs C values; \*\* $P < 0.01$  vs W values.

food substrate, either control or Western-type, the satiety effect of leptin was preserved after fructose supplementation, thus helping to maintain the total amount of ingested calories to similar values.

Besides the well-known hypertriglyceridemic effect, there was also an increase in plasma cholesterol in the fructose-supplemented animals that reached significance in the W + F group. Although this latter effect could depend on the experimental animal used (LDL-R<sup>-/-</sup> mice develop hypercholesterolemia under fructose-supplementation (32); rats normally do not), a recent meta-analysis of controlled feeding trials in humans has shown that a high fructose intake increases plasma LDL-cholesterol and total cholesterol concentrations [4]. The increase in plasma cholesterol could not be attributed to a dietary origin, given that the amount of solid chow ingested was similar (W + F vs W) or even significantly reduced (F vs C) among the dietary groups studied [34]. Our results showing increased liver levels of the specific mRNA for HMGCRD in samples from fructose-supplemented mice, suggests a fructose-driven increase in the endogenous synthesis of cholesterol. This effect can be ascribed to fructose itself, rather than to the increased caloric burden provided by the sugar, as total caloric intake was not different among the “healthy” and “Western” dietary groups, independently of fructose supplementation (see Table 2). The presence of

dietary cholesterol in the Western diet could explain the marked reduction in the expression of HMGCRD observed in W and W + F mice. This finding was in agreement with the increased levels of miRNAs, such as miR-342-5p and especially miR-185-5p in the same groups of mice; the increased expression of these miRNAs has been related to reductions in liver cholesterol synthesis [22] [35]. The progressive reduction in the expression of miR-122-3p, significant in W + F vs W mice, in parallel with lipid deposition in liver (see Fig. 2B), would be in agreement with the reported reduction in miR-122 in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients [36]. Unfortunately, none of the changes detected in the studied miRNAs could explain the effect of fructose supplementation on the expression of the *hmgcrd* gene.

The increase in liver fatty acids being incorporated into triglycerides, due to endogenous synthesis (F), diet (W), or both origins (W + F) was probably the main factor responsible for the increase in liver CD36 expression. CD36 in the plasma membrane of hepatocytes facilitates the incorporation of fatty acids and native and modified lipoproteins into liver metabolism [21], and increased liver expression of CD36 has been detected in experimental models of NAFLD and in NAFLD patients [37]. PPAR $\gamma$ , the expression and activity of which has been related to the development of hepatic steatosis [38], controls the expression of CD36.



**Fig. 5.** Representative images of Section 3, corresponding to the aortic valve leaflets, by specific immunohistochemistry for p65 (A) and F4/80 (B) obtained from C (mice fed standard solid-chow), F (mice fed standard solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*), W (mice fed Western solid-chow), and W + F (mice fed Western solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*). The bar plot on the right-hand of the images shows relative color intensity, as mean  $\pm$  sd, in 3–5 different images of Section 1 to 4 (F4/80)/5 (p65) obtained from the four experimental dietary groups of mice. ## $P < 0.01$  vs C values; \*\* $P < 0.01$  vs W values.

As fatty acids are endogenous ligands of PPAR $\gamma$  [39], the marked accumulation of lipids in liver, especially in the W + F group, could be responsible for the increased expression of PPAR $\gamma$  and its target gene *cd36*. Based on our data, we cannot rule out the possibility that some of the increase in liver cholesterol concentration could be due to the incorporation of plasma lipoproteins by CD36 binding and internalization.

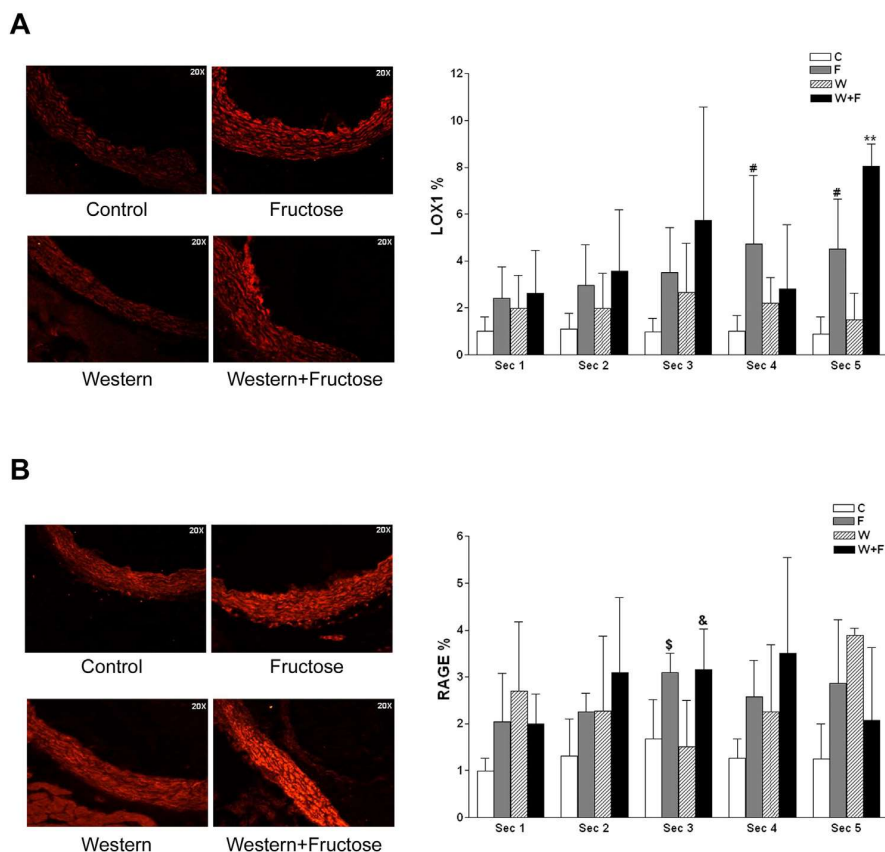
To summarize, fructose supplementation in liquid form in a background of overweight mice consuming an unhealthy, Western-type solid rodent chow, worsened the metabolic phenotype (visceral obesity and dyslipidemia) of these animals even without increasing their total calorie intake, pointing to a specific, deleterious effect of fructose metabolism. These results are in accordance with recent clinical data showing higher sensibility of already obese subjects to the obesogenic effects of fructose [40].

#### 4.2. Impact of fructose supplementation on atherosclerosis

Lipid deposition and local inflammation in the vessel wall, driven by infiltrated monocyte/macrophages, are accepted causes of atheroma formation [41]. Both factors were markedly altered by fructose supplementation in LDLR<sup>-/-</sup> mice. As expected, given that plasma lipids – especially cholesterol – are the main recognized risk factors for atherosclerosis [42], there was a direct correlation between plasma lipids and total atherosclerotic lesion area across the four different dietary groups studied. Fructose supplementation significantly increased plasma lipids and total lesion area in mice fed Western-type solid diet and, more important, independently of the total amount of energy consumed. Thus, despite W + F and W mice had exactly the same caloric intake, W + F animals showed increases in plasma cholesterol ( $\times 1.73$  fold), triglycerides ( $\times 1.39$  fold) and total lesion area ( $\times 2.65$  fold) with respect to W values. Thus, fructose had a deleterious effect on atheromatous

plaque formation that is due to its particular metabolism; substituting calories provided by the solid Western-diet (221 kcal, see Table 2) with the same amount of calories provided by liquid fructose clearly worsened dyslipidemia and aortic lesion.

The recruitment of blood monocytes to the vessel wall and their transformation into lipid-laden macrophages forming early fatty-streaks constitutes the initial building block of atherosclerosis. Oxidative modification of lipids trapped in the vessel wall is the driving force behind macrophage-lipid engulfment and foam-cell formation [41]. Despite the progressive increase in arterial wall lesion area across the four dietary groups, only the two fructose-supplemented groups showed significant increases in macrophage infiltration, as determined by F4/80 immunostaining. Macrophage detection paralleled immunodetection of a modified lipid receptor, LOX-1, that is present on the surface of cells involved in the formation of atherosclerosis plaque, including macrophages, and is responsible for the selective uptake of oxidized-LDL [43]. This effect of fructose was also independent of the type of solid food consumed (either standard or Western-type) and of the total energy intake, once again confirming a specific effect of the fructose molecule on plaque formation that was unrelated to the caloric burden provided by its ingestion. Moreover, in this case, fructose supplementation sufficed to induce similar increases in macrophage recruitment and selective LOX-1 detection, irrespective of the lesion area (compare Figs. 4C, 5B, and 6A). The selective increase in F4/80 and LOX-1 immunostaining in F and W + F groups could be attributed to a specific effect of fructose enhancing the deposition of modified lipoproteins in the vessel wall, which would recruit monocytes through local inflammation and chemoattractant cytokine production [41]. However, we did not detect changes in the immunostaining of phospho-p65, a marker of NF $\kappa$ B activation. NF $\kappa$ B is a pro-inflammatory transcription factor involved in the promotion of inflammation within the arterial wall and atheromatous plaque [44]. The short feeding period (twelve weeks) chosen in our study



**Fig. 6.** Representative images of Section 3, corresponding to the aortic valve leaflets, by specific immunohistochemistry for LOX1 (A) and RAGE (B) obtained from C (mice fed standard solid-chow), F (mice fed standard solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*), W (mice fed Western solid-chow), and W + F (mice fed Western solid-chow plus a 15% fructose solution *ad libitum*). The bar plot on the right hand of the images shows relative color intensity, as mean  $\pm$  sd, in 3–4 different images of Section 1 to 5 obtained from the four experimental dietary groups of mice. # $P < 0.05$  vs C values; \$ $P = 0.06$  – marginally significant – vs C; \*\* $P < 0.01$  vs W values; & $P = 0.09$  – marginally significant – vs W.

to induce atherosclerosis plaque formation [15] could imply that there was an insufficient build-up of the inflammatory process for it to be significantly detected by phospho-p65 immunostaining.

#### 4.3. Study limitations

We are well aware of the shortcomings of our experimental model, as regards the direct extrapolation of data obtained from a genetically modified mouse to humans, and the high amount of fructose ingested, which was higher than the average consumption of fructose by humans. Nevertheless, in our animal model fructose was supplemented for a short period of time, while the patterns of human fructose consumption could span many years.

In addition, although the molecular mechanism involved is not clear at this point, our results indicate that fructose is not merely a “calorie provider” in the human-food chain, but also introduces a deleterious effect inherent to its particular metabolism that could accelerate the development of atherosclerosis and cardiovascular disease, especially in overweight people with unhealthy dietary habits.

In conclusion, our results show that fructose consumption in liquid form increases body weight, atherosclerosis and cholesterol burden in LDLR<sup>-/-</sup> mice independently of energy intake, and significantly in those animals consuming an “unhealthy” solid rodent diet, mimicking a Western-type diet consumed by humans.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcme.2015.10.002>.

#### Acknowledgments

We would like to thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for revising the manuscript.

#### References

- [1] M. Ezzati, E. Riboli, Behavioral and dietary risk factors for noncommunicable diseases, *N. Engl. J. Med.* 369 (2013) 954–964.
- [2] L.A. Schmidt, The toxic truth about sugar, *Nature* 482 (2012) 27–29.
- [3] M. Maersk, A. Belza, H. Stødkilde-jørgensen, S. Ringgaard, E. Chabanova, H. Thomsen, S.B. Pedersen, A. Astrup, B. Richelsen, Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-mo randomized intervention study 1–3, *Am. J. Clin. Nutr.* 95 (2012) 283–289.
- [4] Y.H. Zhang, T. An, R.C. Zhang, Q. Zhou, Y. Huang, J. Zhang, Very high fructose intake increases serum LDL-cholesterol and total cholesterol: a meta-analysis of controlled feeding trials 1–3, *J. Nutr.* 143 (2013) 1391–1398.
- [5] The InterAct consortium, Consumption of sweet beverages and type 2 diabetes incidence in European adults: results from EPIC-InterAct, *Diabetologia* 56 (2013) 1520–1530.
- [6] T.T. Fung, V. Malik, K.M. Rexrode, J.E. Manson, W.C. Willett, F.B. Hu, Sweetened beverage consumption and risk of coronary heart disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 89 (2009) 1037–1042.
- [7] L. de Koning, V.S. Malik, M.D. Kellogg, E.B. Rimm, W.C. Willett, F.B. Hu, Sweetened beverage consumption, incident coronary heart disease, and biomarkers of risk in men, *Circulation* 125 (2012) 1735–1741.
- [8] Q. Yang, Z. Zhang, E.W. Gregg, W.D. Flanders, R. Merritt, F.B. Hu, Added sugar intake and cardiovascular diseases mortality among US adults, *JAMA Intern. Med.* 174 (2014) 516–524.
- [9] P. Mayes, Intermediary metabolism of fructose, *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (1993) 754S–765S.
- [10] L. Vilà, A. Rebollo, G.S. Adalsteisson, M. Alegret, M. Merlos, N. Roglans, J.C. Laguna, Reduction of liver fructokinase expression and improved hepatic inflammation

- and metabolism in liquid fructose-fed rats after atorvastatin treatment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 251 (2011) 32–40.
- [11] N. Roglans, L. Vilà, M. Farré, M. Alegret, R.M. Sánchez, M. Vázquez-Carrera, J.C. Laguna, Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR $\alpha$  activity in fructose-fed rats, *Hepatology* 45 (2007) 778–788.
- [12] A. Rebollo, N. Roglans, M. Baena, R.M. Sánchez, M. Merlos, Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1841 (2014) 514–524.
- [13] L. Vilà, N. Roglans, V. Perna, R.M. Sánchez, M. Vázquez-Carrera, M. Alegret, J.C. Laguna, Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 741–751.
- [14] A. Rebollo, N. Roglans, M. Baena, A. Padrosa, R.M. Sánchez, M. Merlos, M. Alegret, J.C. Laguna, Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats, *J. Nutr. Biochem.* 25 (2014) 250–258.
- [15] R.K. Tangirala, E.M. Rubin, W. Palinski, Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice, *J. Lipid Res.* 36 (1995) 2320–2328.
- [16] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917.
- [17] J. Julve, J.C. Escolà-Gil, N. Rotllan, C. Fiévet, E. Vallez, C. de la Torre, V. Ribas, J.H. Sloan, F. Blanco-Vaca, Human apolipoprotein A-II determines plasma triglycerides by regulating lipoprotein lipase activity and high-density lipoprotein proteome, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 232–238.
- [18] H. Dweep, C. Sticht, P. Pandey, N. Gretz, miRWalk-database: prediction of possible miRNA binding sites by 'walking' the genes of three genomes, *J. Biomed. Inform.* 44 (2011) 839–847.
- [19] S.D. Hsu, F.M. Lin, W.Y. Wu, C. Liang, W.C. Huang, W.L. Chan, W.T. Tsai, G.Z. Chen, C.J. Lee, C.M. Chiu, C.H. Chien, M.C. Wu, C.Y. Huang, A.P. Tsou, H.D. Huang, miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 163–169.
- [20] Y. Zhang, K.S. Ramos, The development of abdominal aortic aneurysms in mice is enhanced by benzo(a)pyrene, *Vasc. Health Risk Manag.* 4 (2008) 1095–1102.
- [21] N. Sahini, J. Borlak, Recent insights into the molecular pathophysiology of lipid droplet formation in hepatocytes, *Prog. Lipid Res.* 54 (2014) 86–112.
- [22] C. Fernández-Hernando, C.M. Ramírez, L. Goedeke, Y. Suárez, MicroRNAs in metabolic disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33 (2013) 178–185.
- [23] V.S. Malik, B.M. Popkin, G.A. Bray, J.-P. Després, F.B. Hu, Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk, *Circulation* 121 (2010) 1356–1364.
- [24] R.J. Johnson, S.E. Perez-Pozo, Y.Y. Sautin, J. Maniatis, L.G. Sanchez-Losada, D.I. Feig, M. Shafiq, M. Segal, R.J. Glasscock, M. Shimada, C. Roncal, T. Nakagawa, Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes, *Endocr. Rev.* 30 (2009) 96–116.
- [25] J.J. DiNicolantonio, S.C. Lucan, The wrong white crystals: not salt but sugar as aetiological in hypertension and cardiometabolic disease, *Open Heart* 1 (2014) e000167.
- [26] M.H. Moghadasian, J.J. Frohlich, B.M. McManus, Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis, *Lab. Invest.* 81 (2001) 1173–1183.
- [27] M. Suzuki, D. Yamamoto, T. Suzuki, M. Fujii, N. Suzuki, M. Fujishiro, T. Sakurai, K. Yamada, High fat and high fructose diet induced intracranial atherosclerosis and enhanced vasoconstrictor responses in non-human primate, *Life Sci.* 80 (2006) 200–204.
- [28] M. Suzuki, D. Yamamoto, T. Suzuki, M. Fujii, N. Suzuki, M. Fujishiro, T. Sakurai, K. Yamada, Effects of fructose-rich high-fat diet on glucose sensitivity and atherosclerosis in nonhuman primate, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 28 (2006) 609–617.
- [29] K. Akira, M. Amano, F. Okajima, F. Okajima, T. Hashimoto, S. Oikawa, Inhibitory effects of amlodipine and fluvastatin on the deposition of advanced glycation end products in aortic wall of cholesterol and fructose-fed rabbits, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 75–81.
- [30] G.S. Getz, C.A. Reardon, Diet and murine atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 242–249.
- [31] B. Cannizzo, A. Luján, N. Estrella, C. Lembo, M. Cruzado, C. Castro, Insulin resistance promotes early atherosclerosis via increased proinflammatory proteins and oxidative stress in fructose-fed ApoE-KO mice, *Exp. Diabetes Res.* 2012 (2012) 941304.
- [32] S. Merat, F. Casanada, M. Sutphin, W. Palinski, P. Reaven, Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 1223–1230.
- [33] L. Gautron, J.K. Elmquist, Sixteen years of counting: an update on leptin in energy balance, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 2087–2093.
- [34] S. Subramanian, L. Goodspeed, S. Wang, J. Kim, L. Zeng, G.N. Ioannou, W.G. Haigh, M.M. Yeh, K.V. Kowdley, K.D. O'Brien, S. Pennatur, A. Chait, Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice, *J. Lipid Res.* 52 (2011) 1626–1635.
- [35] C. Fernández-Hernando, Y. Suárez, K.J. Rayner, K.J. Moore, MicroRNAs in lipid metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 22 (2011) 86–92.
- [36] O. Cheung, P. Puri, C. Eicken, M. Contos, F. Mirshahi, J. Maher, J. Kellum, H. Min, V. Luketic, A.J. Sanyal, Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression, *Hepatology* 48 (2008) 1810–1820.
- [37] J. Lavoie, M. Gauthier, Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise, *Cell. Mol. Life Sci.* 1–17 (2006).
- [38] O. Gavrilova, M. Haluzik, K. Matsusue, J.J. Cutson, L. Johnson, K.R. Dietz, C.J. Nicol, C. Vinson, F.J. Gonzalez, M.L. Reitman, Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 34268–34276.
- [39] M. Schupp, M.A. Lazar, Endogenous ligands for nuclear receptors: digging deeper, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 40409–40415.
- [40] C.B. Ebbeling, H.A. Feldman, V.R. Chomitz, T.A. Antonelli, S.L. Gortmaker, S.K. Osganian, D.S. Ludwig, A randomized trial of sugar-sweetened beverages and adolescent body weight, *N. Engl. J. Med.* 367 (15) (2012) 1407–1416.
- [41] I.F. Charo, R. Taub, Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (2011) 365–376.
- [42] J.D. Brunzell, M. Davidson, C.D. Furberg, R.B. Goldberg, B.V. Howard, J.H. Stein, J.L. Witztum, Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk: consensus statement from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation, *Diabetes Care* 31 (2008) 811–822.
- [43] D.J. Shaw, R. Seese, S. Ponnambalam, R. Ajjan, The role of lectin-like oxidised low-density lipoprotein receptor-1 in vascular pathology, *Diab. Vasc. Dis. Res.* 11 (2014) 410–418.
- [44] A.R. Brasier, The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation, *Cardiovasc. Res.* 86 (2010) 211–218.

