

Persistenza delle alterazioni del pathway di segnalazione delle neurotrofine e dell'omeostasi dei neurotrasmettitori nella corteccia frontale di ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio

Luisa Cigliano¹, Antonio Dario Troise², Francesca De Palma¹, Natasha Petecca¹, Arianna Mazzoli¹, Susanna Iossa¹, Andrea Scaloni², Maria Stefania Spagnuolo²

¹ Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia.

² Istituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo (ISPAAM), CNR, Portici (Na), Italia.

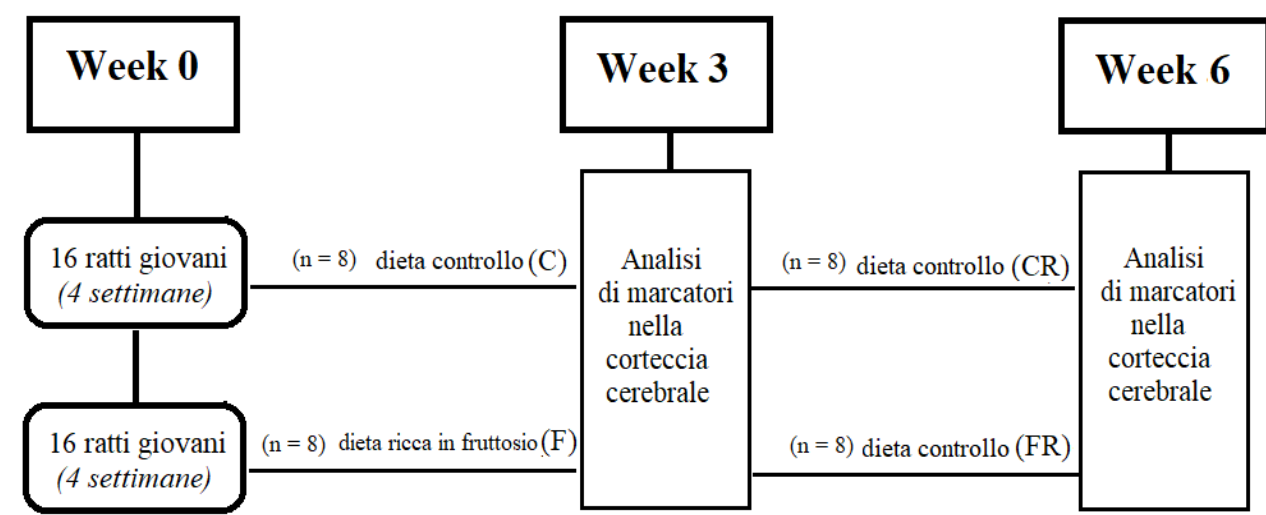


Introduzione

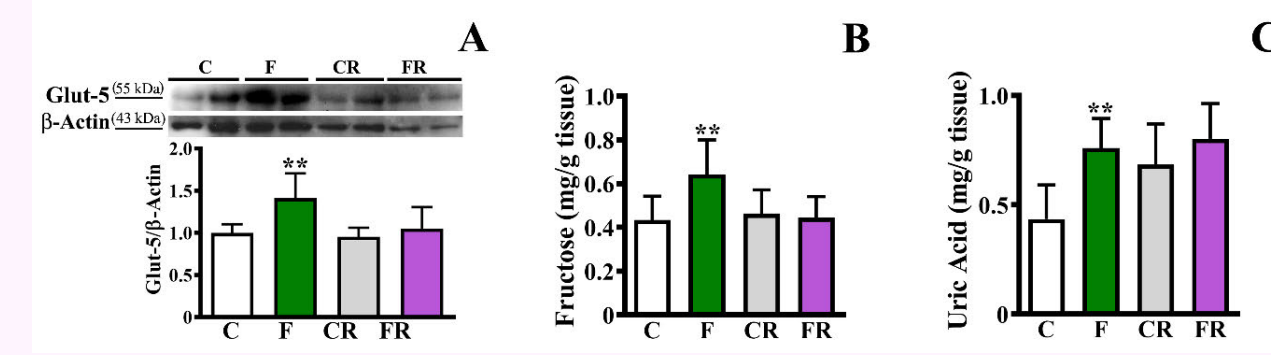
Negli ultimi decenni si è verificato un aumento esponenziale del contenuto di fruttosio nella dieta, in particolare di bambini e adolescenti, in quanto lo sciroppo di mais, il cui contenuto di fruttosio può raggiungere anche il 50%, è ampiamente usato come dolcificante per bevande, snack e alimenti trasformati in generale. È stato dimostrato che il consumo di alimenti ricchi in fruttosio contribuisce all'aumento del rischio di obesità, disordini metabolici, e declino cognitivo. Nonostante molti studi abbiano evidenziato gli effetti deleteri della dieta ricca in fruttosio sulla fisiologia cerebrale, sono disponibili pochi dati sull'effetto di una dieta di breve durata sulla corteccia frontale, che svolge un ruolo chiave nella regolazione di funzioni cognitive come la memoria e l'attenzione, e sull'eventuale persistenza di tali alterazioni. Scopo del progetto è stato identificare le alterazioni indotte da una dieta ricca in fruttosio nella corteccia di ratti adolescenti e valutare se tali disfunzioni persistono fino all'età adulta dopo il ritorno a una dieta sana.

Metodi

Ratti maschi (30 giorni) sono stati alimentati con una dieta ricca in fruttosio (F) o una dieta standard per roditori (C) per 3 settimane. Dopo questo periodo, i ratti alimentati con fruttosio sono stati alimentati con dieta controllo per altre 3 settimane (gruppo FR) e confrontati con gli animali che avevano ricevuto la dieta di controllo per l'intero periodo sperimentale (gruppo CR).

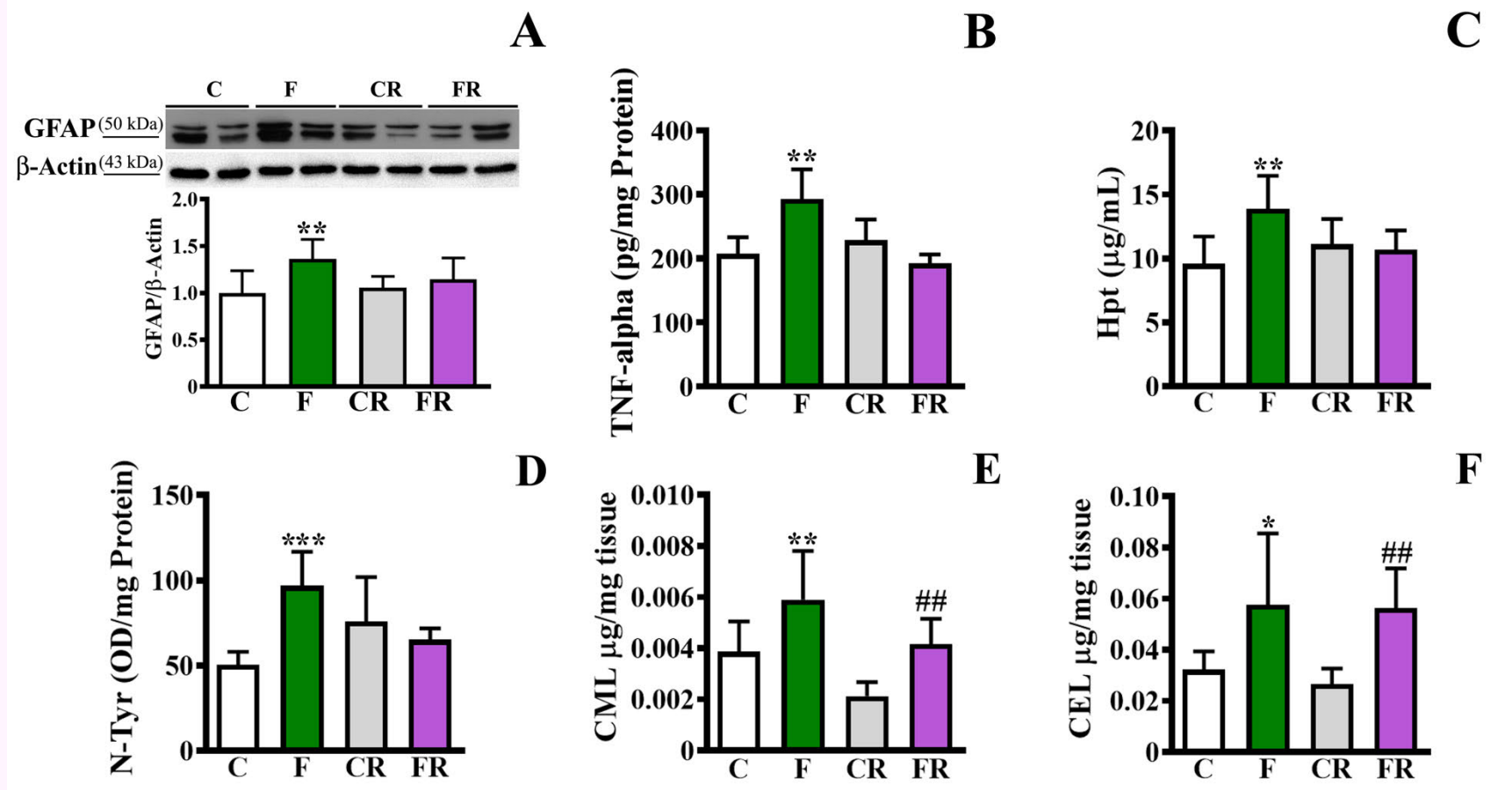


Metabolismo del fruttosio



Al fine di valutare se la dieta ricca in fruttosio influenza i livelli del trasportatore specifico di tale zucchero (Glut-5) e il suo metabolismo, sono stati analizzati i livelli della proteina Glut-5, la concentrazione di fruttosio e i livelli di uno dei prodotti finali del suo metabolismo, ovvero l'acido urico. La quantità di Glut-5 è risultata significativamente più alta nella corteccia frontale dei ratti F rispetto ai ratti C, mentre questo aumento non è stato osservato nei ratti FR rispetto ai ratti CR. In linea con l'aumento di Glut-5, è stato riscontrato un incremento significativo dei livelli di fruttosio e acido urico nei ratti F rispetto ai ratti C, mentre non sono state riscontrate differenze significative tra il gruppo FR e CR. Sono riportate le medie \pm SEM di 8 ratti/gruppo. ** $P < 0,01$ vs C (ANOVA a una via seguita dal *post-test* di Bonferroni).

Neuroinfiammazione e stress ossidativo



Per stabilire se la dieta ricca in fruttosio induce neuroinfiammazione, si è proceduto alla valutazione dei livelli della proteina GFAP, marcatore di astrogliosi, della citochina pro-infiammatoria TNF-alfa e della proteina Hpt, un marcatore di infiammazione molto sensibile ai cambiamenti nutrizionali (Spagnuolo et al., 2015; Mazzoli et al., 2020). La somministrazione della dieta ricca di fruttosio è risultata associata a un aumento dei livelli di GFAP, TNF-alfa e Hpt nei ratti del gruppo F rispetto ai ratti del gruppo C. Tali alterazioni non persistono in seguito al ritorno ad una dieta di controllo, poiché non è stata rilevata alcuna differenza nelle concentrazioni dei marcatori analizzati tra i ratti CR e FR. L'alimentazione con fruttosio è risultata associata all'induzione di stress ossidativo. Infatti è stato rilevato un aumento della concentrazione di nitro-tirosina (N-Tyr), indice di danno ossidativo proteico indotto dal perossinitrito (Bartesch et al., 2018), nella corteccia frontale dei ratti del gruppo F. Inoltre, è stato osservato che le concentrazioni di N-carbossimetilossilina (CML) e N-carbossietilossilina (CEL), due prodotti finali di glicazione avanzata (Haddad et al., 2019), entrambi in forma libera, sono più alte nella corteccia frontale dei ratti F rispetto ai ratti C. In particolare, dopo il passaggio alla dieta di controllo, le alterazioni dei livelli di CML e CEL sono risultate persistenti. Sono riportate le medie \pm SEM di 8 ratti/gruppo. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs C; ## $P < 0,01$ vs CR (ANOVA a una via seguita dal *post-test* di Bonferroni).

Neurotrofine

Dal momento che le neurotrofine hanno un ruolo chiave nella regolazione di differenziamento, neurogenesi, sopravvivenza e plasticità sinaptica, è stato valutato l'impatto della dieta sulla segnalazione di BDNF e NGF.

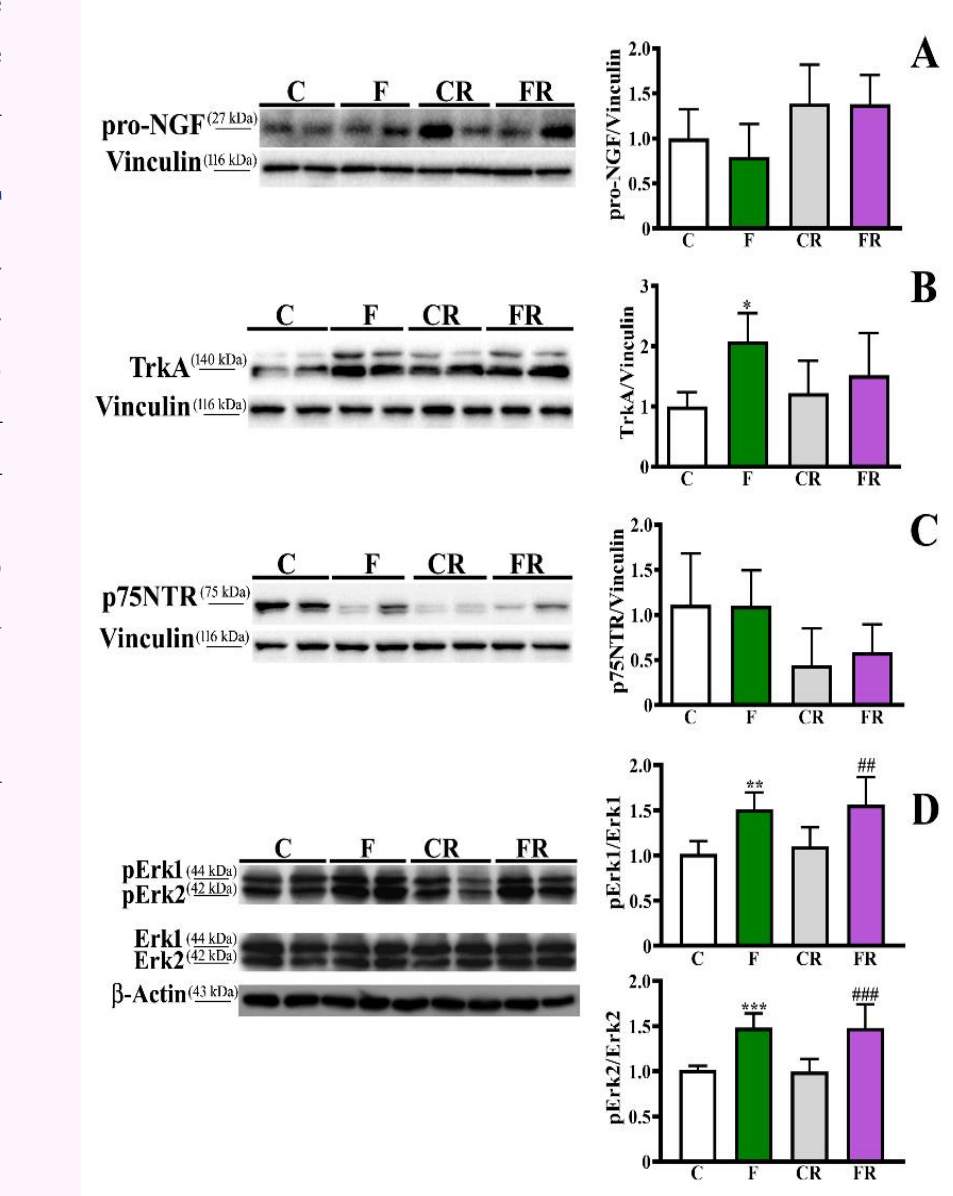
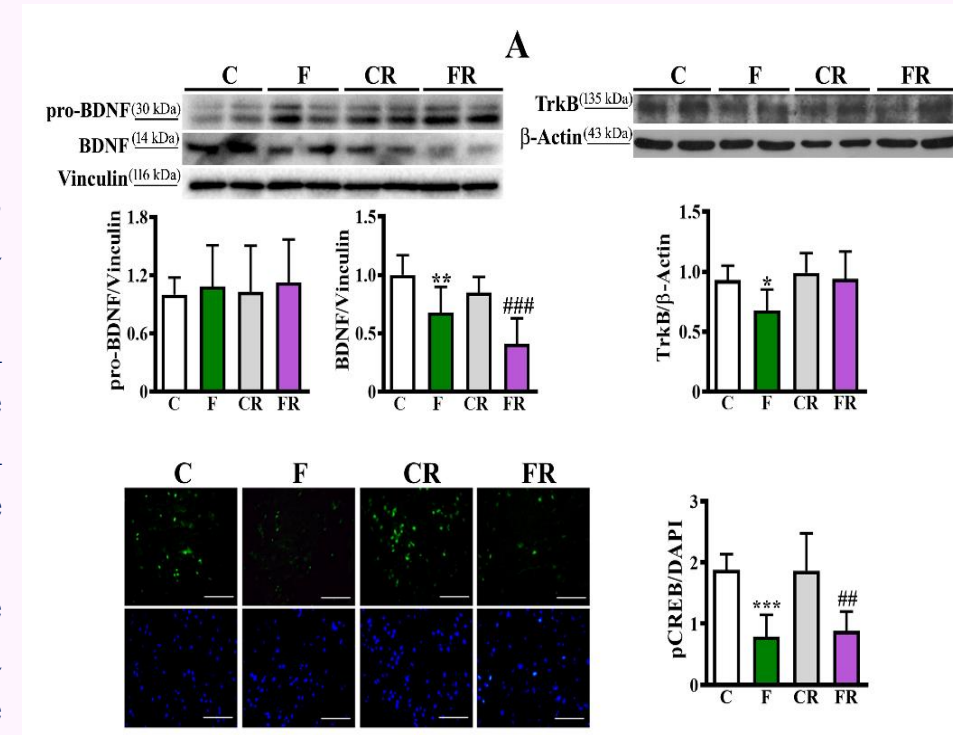
Nei ratti trattati con fruttosio è stata osservata una significativa diminuzione della forma matura di BDNF; è interessante notare che tale alterazione persiste dopo il ritorno ad una dieta controllo, come mostrato dal confronto tra ratti FR e CR. Non sono state osservate invece differenze dei livelli del precursore di BDNF (pro-BDNF), il che suggerisce che la dieta ricca in fruttosio potrebbe indurre alterazioni a livello post-traduzionale.

Poiché le funzioni svolte dal BDNF sono mediate dal legame al suo recettore ad alta affinità TrkB, è stata analizzata l'espressione proteica di tale recettore. La concentrazione di TrkB è risultata significativamente più bassa nella corteccia dei ratti F rispetto a quelli C, mentre non sono state rilevate differenze tra il gruppo CR e FR. Inoltre, è stata valutata l'attivazione di CREB, il principale effettore a valle del BDNF, coinvolto nella trascrizione di geni essenziali per la plasticità sinaptica, analizzandone l'entità di fosforilazione. In linea con la diminuzione del BDNF, è stata riscontrata, mediante immunofluorescenza, una diminuzione della fosforilazione di CREB (p-CREB) sia nella corteccia dei ratti F rispetto a C, sia nella corteccia dei ratti FR rispetto a CR.

È noto che nel cervello umano, di ratto e di topo, la forma matura di NGF è assente, mentre pro-NGF rappresenta la specie predominante (Fahnestock et al., 2001; Fahnestock et al., 2019). In accordo con la letteratura, la forma matura di NGF non è stata rilevata in nessuno dei campioni di corteccia analizzati. Non sono state osservate variazioni dei livelli di pro-NGF, mentre la concentrazione di TrkA, il recettore ad alta affinità di NGF, è risultata aumentata nei ratti F rispetto a C. Tali differenze non sono risultate persistenti, come evidenziabile dal confronto tra gruppo CR e FR. Inoltre, non sono stati osservati cambiamenti nei livelli di p75NTR, recettore a bassa affinità di NGF.

Il grado di fosforilazione di Erk1 ed Erk2 è risultato significativamente aumentato nei ratti F rispetto ai ratti C, e tale aumento è risultato persistente, come evidenziabile dal confronto dei ratti del gruppo FR con quelli del gruppo CR.

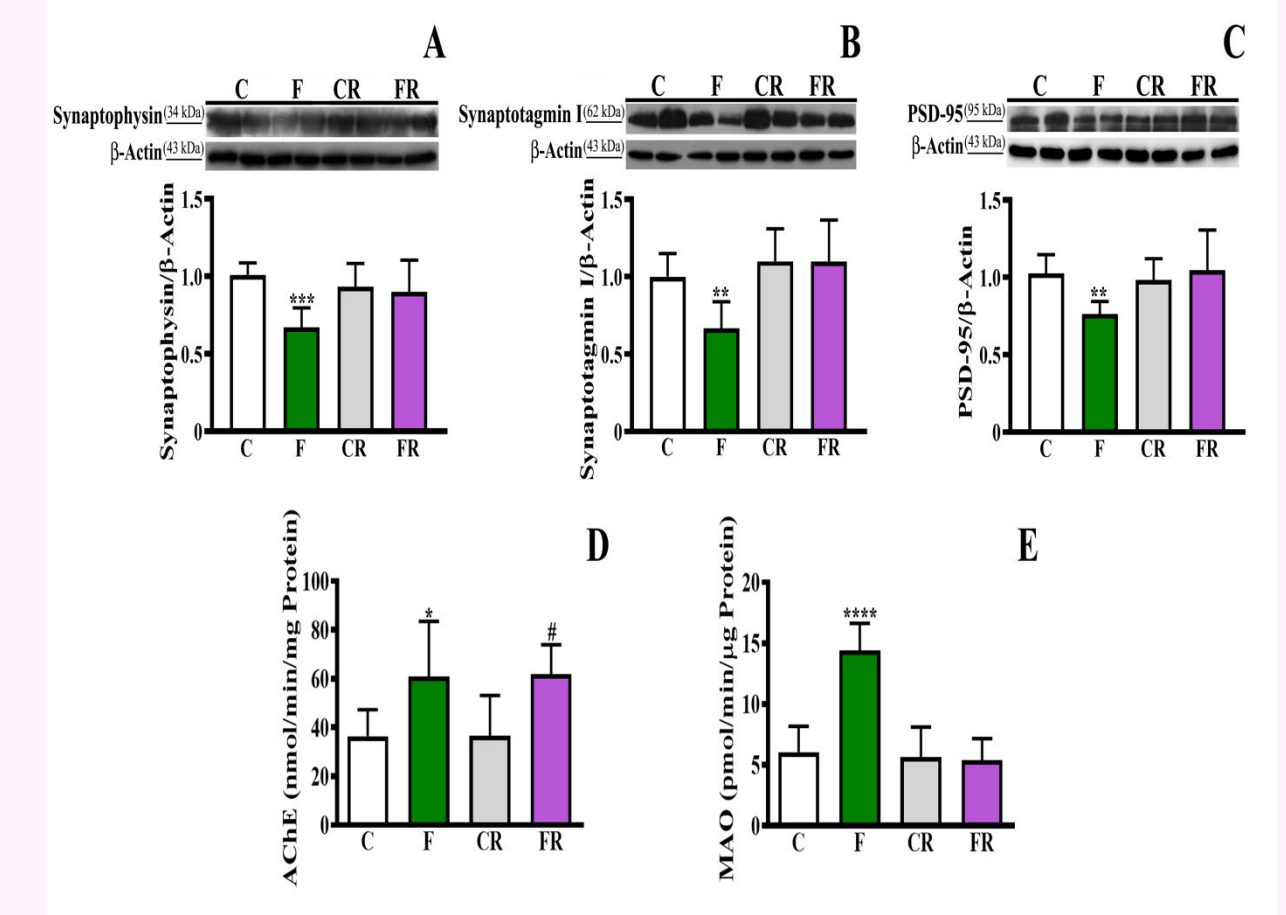
Sono riportate le medie \pm SEM di 8 ratti/gruppo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs C. ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ vs CR (ANOVA a una via seguita dal *post-test* di Bonferroni).



Proteine sinaptiche

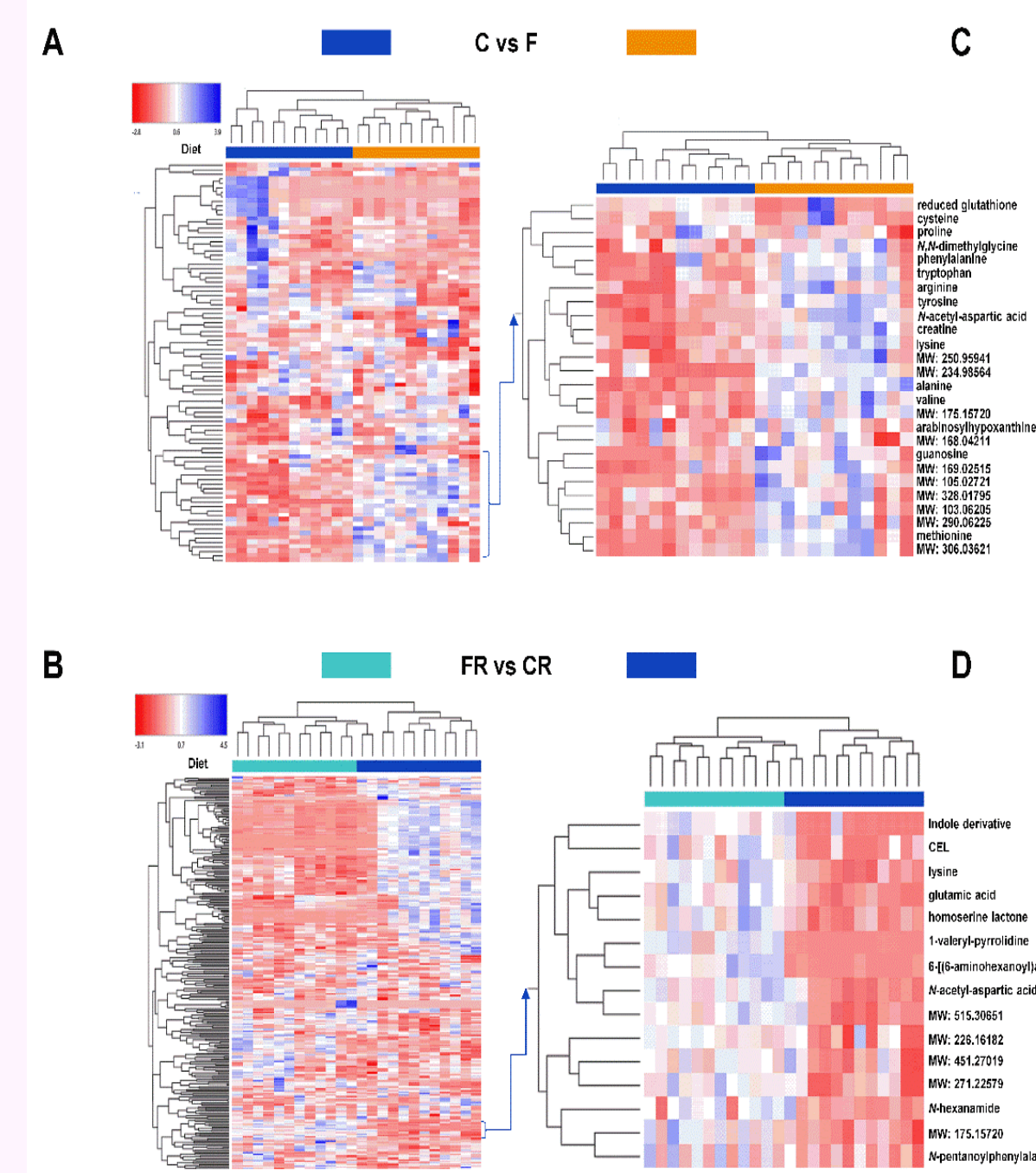
Poiché BDNF svolge un ruolo cruciale nella regolazione della trasmissione sinaptica, si è proceduto ad analizzare l'effetto della dieta ricca in fruttosio sulla concentrazione di due proteine presinaptiche, sinaptosina e sinaptotagmina I, e della proteina postsinaptica PSD-95, che svolgono un ruolo chiave nella plasticità sinaptica. La dieta arricchita in fruttosio induce una riduzione significativa dell'espressione delle tre le proteine, e il passaggio alla dieta controllo ha permesso un completo recupero delle alterazioni. L'attività dell'enzima acetilcolinesterasi, che svolge un ruolo chiave nella regolazione del pathway colinergico, è risultata significativamente più alta nel gruppo F rispetto al gruppo C. L'aumento è risultato persistente nel gruppo FR rispetto al gruppo CR. L'attività dell'enzima monoammina ossidasi, che regola il livello dei neurotrasmettitori monoaminergici, è risultata maggiore nel gruppo alimentato con dieta ricca in fruttosio, ma non sono osservate differenze tra il gruppo CR e FR.

Sono riportate le medie \pm SEM di 8 ratti/gruppo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs C. # $P < 0,05$ vs CR (ANOVA a una via seguita dal *post-test* di Bonferroni).



Metaboliti e neurotrasmettitori

Gli omogenati di corteccia prefrontale sono stati purificati mediante estrazione su fase solida a bassa pressione per la separazione da proteine e fosfolipidi; successivamente i surnatanti sono stati separati mediante cromatografia liquida in modalità HILIC accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione. Il primo obiettivo è stato di tracciare un parallelo tra i gruppi che hanno ricevuto diete differenti (C ed F) e tra i gruppi CR ed FR, per delineare i metaboliti discriminanti tra la dieta con fruttosio (evidenziata in arancione) e la dieta controllo (evidenziata in blu) dopo normalizzazione delle aree, mentre nella heatmap C sono state riportate in dettaglio le molecole sotto-rappresentate e sovra-rappresentate dove emergono classi molecolari appartenenti ad aminoacidi, aminoacidi modificati e zuccheri. Similmente, nella heatmap B, i due gruppi CR e FR sono nettamente separati e indicati rispettivamente in azzurro e blu. Dopo analisi discriminante, le molecole sovra-rappresentate e sotto-rappresentate nei due trattamenti sono state incluse all'interno di un nuovo set di riproccamento (Metabolika pathway, Thermo) per la definizione dei pathway metabolici maggiormente influenzati dal trattamento con fruttosio. Nello specifico sono stati riportati pathway metabolici associati al metabolismo di aminoacidi aromatici e solforati. Viceversa, nel caso del confronto tra CR e FR, oltre ad aminoacidi aromatici e lisina, anche acido glutammico e aspartico, a loro volta coinvolti nel ciclo degli acidi tricarbossilici, presentano differenze significative.



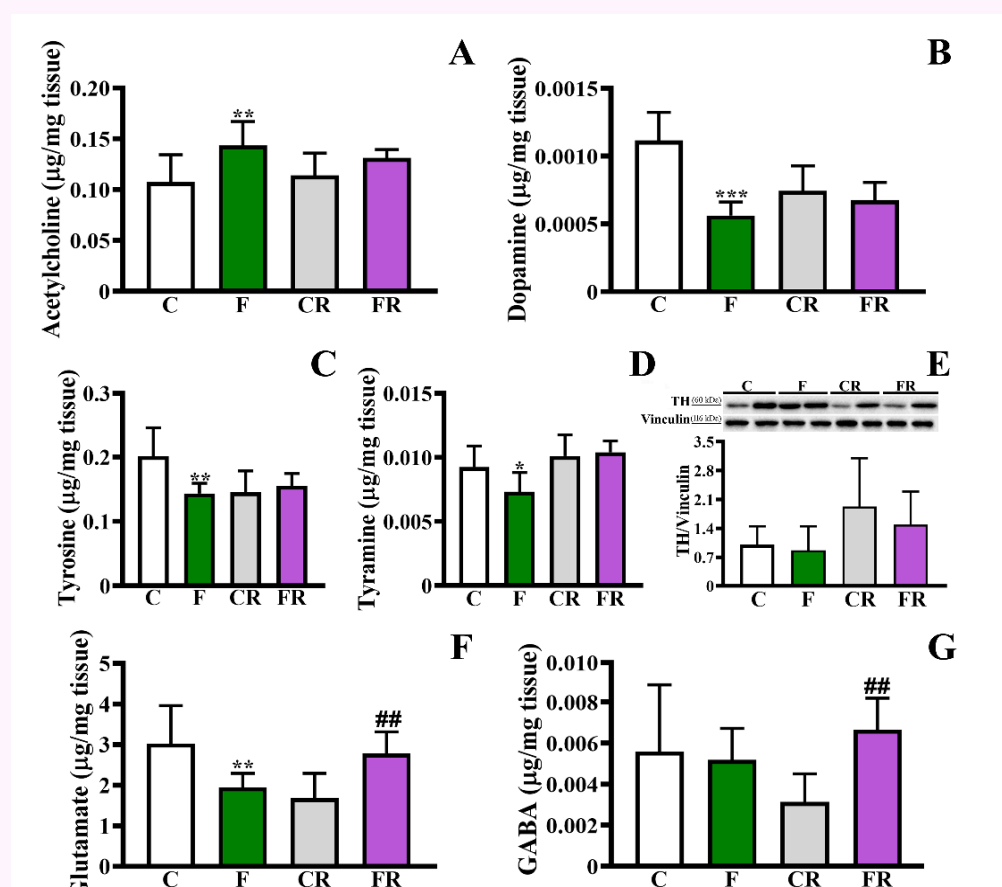
Si è proceduto alla valutazione dell'impatto della dieta ricca in fruttosio sul profilo dei principali neurotrasmettitori.

I livelli di acetilcolina (ACh), uno dei principali neuromodulatori del sistema nervoso centrale che regola l'attenzione, l'apprendimento e la memoria (Dannenberg et al., 2017), sono risultati significativamente più alti nei ratti trattati rispetto ai controlli e tale variazione non è risultata persistente in seguito al ritorno alla dieta di controllo.

La concentrazione di dopamina, il neurotrasmettitore che regola l'attività motoria e l'emozione (Conde Rojas et al., 2020; Grogan et al., 2020), è risultata inferiore nei ratti F rispetto a quelli C. In linea con la diminuzione di dopamina nel gruppo F, è stato rilevato che i livelli di entrambi i suoi precursori, ovvero tirosina e tiramina, sono più bassi nel gruppo F rispetto al gruppo C. Tali differenze non sono risultate persistenti dopo il passaggio alla dieta standard. Non sono state, invece, evidenziate differenze nella quantità di tirosina idrossilasi (TH), l'enzima che catalizza la tappa limitante della biosintesi delle catecolamine, tra i gruppi F e C.

I livelli di glutammato, il principale neurotrasmettitore eccitatorio, sono risultati significativamente più bassi nei ratti F rispetto ai ratti C, ed è interessante notare una tendenza inversa dopo il passaggio alla dieta di controllo, in quanto i ratti FR presentano livelli più elevati di glutammato rispetto ai ratti CR. Infine, è stato rilevato che la concentrazione di acido γ -aminobutirico (GABA), il principale neurotrasmettitore inibitorio, non differisce tra ratti C e F, mentre il passaggio alla dieta di controllo è risultato associato a un aumento di livelli di GABA nei ratti FR rispetto ai ratti CR.

Sono riportate le medie \pm SEM di 8 ratti/gruppo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs C. ## $P < 0,01$ vs CR (ANOVA a una via seguita dal *post-test* di Bonferroni).



Conclusioni

I risultati ottenuti dimostrano che una dieta ricca in fruttosio, anche di breve durata, compromette la funzionalità cerebrale. In particolare, nella corteccia frontale di animali giovani, la dieta provoca neuroinfiammazione, stress ossidativo, aumentata formazione di prodotti finali di glicazione avanzata, disfunzione della segnalazione delle neurotrofine e malfunzionamento della trasmissione sinaptica. Inoltre, si osserva un'alterazione dell'equilibrio dei neurotrasmettitori eccitatori/inibitori, il quale è fondamentale per il corretto funzionamento del sistema nervoso centrale. Alcune delle alterazioni indotte dalla dieta (concentrazione di BDNF, CML, CEL, neurotrasmettitori, attività dell'acetilcolinesterasi) persistono anche in seguito al ritorno ad una dieta sana e ciò suggerisce l'importanza di limitare il consumo di zucchero e di prodotti industriali adizionati con sciroppo di mais ad alto contenuto di fruttosio, in quanto un'eccessiva assunzione di fruttosio potrebbero influenzare la fisiologia cerebrale non solo immediatamente, ma anche a lungo termine.

Contatti
maristefania.spagnuolo@cnr.it
antoniodario.troise@cnr.it
andrea.scaloni@cnr.it



Contatti
luisa.cigliano@unina.it
francesca.depalma@unina.it
natasha.petecca@unina.it
arianna.mazzoli@unina.it
susanna.iossa@unina.it

