



UNIVERSITAT  
JAUME•I

# Síndrome metabólico y abuso de alcohol: efectos de la acción combinada de ambas patologías en el balance oxidativo del sistema nervioso central

Doctorando

RICARD ROMERO CANO

Directores de tesis

Dr. PABLO BALIÑO REMIRO

Dra. MARÍA MURIACH SAURÍ

OCTUBRE 2024





Programa de Doctorado en Ciencias  
Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I

Título de la tesis

Síndrome metabólico y abuso de alcohol étílico: efectos de la  
acción combinada de ambas patologías en el balance oxidativo del  
sistema nervioso central

Memoria presentada por Ricard Romero Cano para optar al grado de doctor por la  
Universitat Jaume I

Ricard Romero Cano

Pablo Baliño Remiro

María Muriach Saurí

Castelló de la Plana, octubre 2024



# FINANCIACIÓN

El proyecto de investigación ha sido financiado por la Universitat Jaume I (UJI) a través de las subvenciones UJI-A2016-03 y UJI-B2019-38.

Licencia CC Reconocimiento - Compartir igual (BY-SA).





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Pablo y María por la oportunidad de poder realizar la tesis doctoral en su grupo de investigación. No tengo palabras para expresar el agradecimiento que tengo por la ayuda recibida y el tiempo que habéis dedicado para guiarme en este proceso para que esta tesis llegue a buen puerto. Gracias por acogerme como a uno más y por todo lo que me habéis enseñado durante estos años, que no es poco. No podría haber conseguido esto sin vosotros.

En segundo lugar, me gustaría dar las gracias a Carlos, mi compañero de laboratorio. Cuantas horas hemos pasado juntos ultimando métodos y solucionando problemas. Gracias por el apoyo recibido y haber estado ahí para echar una mano cuando ha hecho falta. Atrás quedan las horas de: ¿Por qué no funciona? Y cientos de cafés para filosofar de la vida. Tu amistad es una de las grandes recompensas de la tesis.

No puedo olvidar a mis compañeros del SCIC, quienes me dieron ideas y me cubrieron las espaldas en más de una ocasión; quienes me ayudaron a crecer como persona e investigador; quienes me acogieron y me animaron a tomar la decisión de realizar la tesis. A todos vosotros, gracias.

También me gustaría dedicar unas palabras a mi familia, en especial a mis padres, por su apoyo y ánimo en estos años, ya que me animaron a seguir a pesar de las adversidades y a nunca tirar la toalla.

Por último, quiero agradecer a Marta todo su apoyo, cariño y paciencia. Muchas han sido las horas que te he quitado para poder perseguir mi objetivo y tú lo has asumido, animándome e incluso pasando algunas jornadas en el laboratorio conmigo. En toda tesis hay momentos de frustración, desasosiego y ganas de abandonar, pero tú siempre supiste

qué decir para animarme y que continuase esta tarea. Por tus ánimos, las veces que has aguantado mi frustración y enfado, por los dolores de cabeza que te he dado, esta tesis es también tuya.

Seguro que me dejo a mucha gente que en estos años han contribuido de manera directa o indirecta a esta tesis o me han aportado algo valioso a mi vida durante esta etapa. Sentíos incluidos en estos agradecimientos, que también van por vosotros.

A todos vosotros, de todo corazón, ¡GRACIAS!







## **ABREVIATURAS**



<b>8OHdG</b>	8-hidroxi-desoxiguanosina
<b>AACE</b>	Asociación Americana de Endocrinología Clínica
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AGE</b>	Productos finales de glicación avanzada
<b>AHA/NHLBI</b>	Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y la sangre de la Asociación Americana del Corazón
<b>Akt</b>	Proteína quinasa B
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>Ay/a</b>	Ratones con mutación en el gen que codifica el péptido agouti
<b>BMI</b>	Índice de masa corporal
<b>CVD</b>	Enfermedades Cardiovasculares
<b>DASH</b>	Recomendaciones nutricionales para parar la hipertensión
<b>db/db</b>	Ratones C57BL6 con mutación en el gen db
<b>DID</b>	Drinking in the dark
<b>EGIR</b>	Grupo Europeo para el estudio de la Resistencia a la Insulina
<b>ER</b>	Retículo endoplasmático
<b>FFA</b>	Ácidos grasos libres
<b>Foxo1</b>	Proteína de cabeza de tenedor O1
<b>GCK</b>	Glucoquinasas
<b>GH/ IGF-1</b>	Eje hipotalámico-pituitario-hormona de crecimiento/factor de crecimiento similar a la insulina-1
<b>Glut2</b>	Transportador de glucosa 2
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa 4
<b>GSH</b>	Glutati6n Reducido
<b>GSSG</b>	Glutati6n oxidado

<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HPA</b>	Eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal
<b>HPG</b>	Eje hipotalámico-pituitario-gonadal
<b>HPP</b>	Eje hipotálamo-hipófisis posterior
<b>HPT</b>	Eje hipotalámico-pituitario-tiroides
<b>IDF</b>	Federación internacional de la Diabetes
<b>IKK-<math>\beta</math></b>	Inhibidor de la subunidad $\beta$ de la quinasa $\kappa\beta$
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6
<b>iPSC</b>	Células madre pluripotenciales inducidas
<b>IRS1</b>	Receptor de insulina 1
<b>IRS2</b>	Receptor de insulina 2
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógeno
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MetS</b>	Síndrome Metabólico
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
<b>NCEP</b>	Programa Nacional de Educación sobre Colesterol de Estados Unidos
<b>NCEP:ATPIII</b>	Panel de Expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos de la NCEP
<b>NF-<math>\kappa\beta</math></b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas $\kappa$ de las células $\beta$
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b><i>ob/ob</i></b>	Ratones C57BL6 con mutación en el gen Ob
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAI-1</b>	Activador de Plasminógeno 1

<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SEA</b>	Servicio Experimentación Animal
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>T2D</b>	Diabetes tipo 2
<b>TCA</b>	Ácido tricarbóxico
<b>TLR-2</b>	Receptor Toll-like 2
<b>TLR-4</b>	Receptor Toll-like 4
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>VAT</b>	Tejido adiposo visceral
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad
<b><math>\gamma</math>-GT</b>	Gamma glutamil transpeptidasa





## ÍNDICE



FINANCIACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ABREVIATURAS.....	xi
ÍNDICE.....	xvii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	3
MARCO TEÓRICO.....	5
a.    EL SÍNDROME METABÓLICO .....	7
i.    Definiciones del MetS.....	8
ii.   MetS en el mundo y enfermedades relacionadas .....	16
iii.  Fisiopatología.....	19
iv.   Tratamiento del MetS.....	22
v.    Controversias relacionadas con el MetS.....	25
vi.   Diabetes y MetS.....	27
vii.  MetS y sistema nervioso central.....	32
b.    EL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO .....	34
i.    Metabolismo del alcohol etílico.....	35
ii.   Efectos del consumo de alcohol etílico sobre la salud .....	36
c.    ESTRÉS OXIDATIVO COMO MECANISMO FISIOPATOLÓGICO .....	41
i.    Estrés oxidativo. Radicales libres .....	41
ii.   Papel patogénico. ....	43
iii.  Peroxidación lipídica .....	43
iv.   Defensa antioxidante.....	45
d.    ESTRÉS OXIDATIVO, METS, DIABETES Y CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO.....	49
e.    MODELOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	56
i.    Modelos animales de MetS y diabetes.....	57
ii.   Modelos experimentales de consumo de alcohol etílico .....	61
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	65
MATERIAL Y MÉTODOS .....	71
a.    PROCEDIMIENTO EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	73
i.    Distribución temporal .....	74
ii.   Tamaño y grupos muestrales.....	74
iii.  Requerimientos éticos .....	74
b.    REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS .....	75
c.    GLUCEMIAS, SOBRECARGA GLUCOSA, INSULINEMIAS .....	76

i.	Glucemias.....	76
ii.	Sobrecarga de glucosa .....	76
iii.	Insulinemias .....	77
iv.	Determinación de niveles de alcohol etílico en sangre .....	77
v.	Test conductuales .....	77
vi.	Homogenado de las muestras .....	80
vii.	Métodos enzimáticos.....	81
viii.	Métodos moleculares .....	84
ix.	Contenido de proteínas .....	87
x.	Análisis estadístico.....	88
RESULTADOS .....		91
a.	NIVELES DE ALCOHOL ETÍLICO EN SANGRE.....	93
b.	EFFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN EL PESO .....	94
c.	EFFECTOS DEL ALCOHOL ETÍLICO EN LA GLUCEMIA BASAL.....	95
d.	EFFECTOS DEL ALCOHOL ETÍLICO EN LA CONCENTRACIÓN DE INSULINA .....	96
e.	EFFECTOS DEL ALCOHOL ETÍLICO EN LA PRUEBA DE SOBRECARGA DE GLUCOSA .....	97
f.	EFFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA MEMORIA A LARGO Y CORTO PLAZO EN ANIMALES CON METS.....	98
g.	EFFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA (GR) Y GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx).....	100
h.	EFFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA CONCENTRACIÓN DE GSH.....	102
i.	EFFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA CONCENTRACIÓN DE GSSG ....	103
j.	EFFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA RELACIÓN GSH/GSSG .....	104
k.	EFFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA CONCENTRACIÓN DE L-CISTEÍNA	105
l.	EFFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA CONCENTRACIÓN DE MDA ....	106
DISCUSIÓN.....		109
a.	CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL ETÍLICO EN EL MODELO DE RATÓN OB.....	111
i.	Método de intoxicación .....	111
ii.	Pesos ratones.....	115
iii.	Niveles de insulina y glucemia .....	117
iv.	Sensibilidad a la insulina .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
v.	Otros (mortalidad y datos preliminares estudio largo plazo).....	122
vi.	Resumen .....	123
b.	EFFECTOS COGNITIVOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN RATONES OB.....	125
c.	EFFECTOS DEL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL ETÍLICO EN EL SISTEMA OXIDATIVO DEL CEREBRO DE LOS RATONES OB .....	131

i. GSH, GSSG, GR y GPx .....	132
ii. L-Cisteína.....	133
iii. MDA .....	134
iv. Resumen .....	136
d. EFECTOS DE LA ACCIÓN COMBINADA DEL METS Y EL ABUSO DE ALCOHOL ETÍLICO ..	138
CONCLUSIONES .....	145
ANEXOS .....	151
ANEXO I: Autorización Procedimiento Experimentación Animal.....	153
BIBLIOGRAFÍA.....	155



## RESUMEN

El síndrome metabólico es una agrupación de anormalidades fisiológicas y bioquímicas entre las que se incluyen la resistencia a la insulina, obesidad central, dislipidemia, hipertensión e intolerancia a la glucosa. El consumo de alcohol etílico, común en pacientes con este síndrome, puede modular algunas de estas patologías, aunque también afecta al sistema nervioso central y al balance oxidativo. El objetivo de este trabajo es determinar los efectos en el balance oxidativo del sistema nervioso central del consumo de alcohol etílico en un modelo ratón de síndrome metabólico (ratones *ob/ob*). Tras un periodo de seis semanas, en que se monitorizaron los niveles de glucemia basal, se obtuvieron muestras cerebrales y se midieron la actividad enzimática, las concentraciones de MDA, GSSG, GSH e insulina y se realizaron tests cognitivos y de sobrecarga de glucosa. El consumo de alcohol etílico modula el estado glucémico y altera el balance oxidativo de los ratones *ob/ob*.

**Palabras clave:** síndrome metabólico, alcohol etílico, diabetes, estrés oxidativo.





## ABSTRACT

Metabolic syndrome is a cluster of physiological and biochemical abnormalities including insulin resistance, central obesity, dyslipidemia, hypertension, and glucose intolerance. The consumption of ethyl alcohol, common in patients with this syndrome, can modulate some of these pathologies, although it also affects the central nervous system and oxidative balance. The objective of this study is to determine the effects on the oxidative balance of the central nervous system from the consumption of ethyl alcohol in a mouse model of metabolic syndrome (*ob/ob* mice). After a six-week period, during which basal glycemia levels were monitored, brain samples were obtained, and enzymatic activity, concentrations of MDA, GSSG, GSH, and insulin were measured, and cognitive and glucose tolerance tests were performed. The consumption of ethyl alcohol modulates the glycemic state and alters the oxidative balance of *ob/ob* mice.

**Keywords: metabolic syndrome; ethyl alcohol; diabetes; oxidative stress.**



## **MARCO TEÓRICO**



## a. EL SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico (MetS), es una agrupación de anormalidades fisiológicas y bioquímicas caracterizadas por ser factores de riesgo de enfermedades cardíacas, aterosclerosis, diabetes y otros problemas de salud. Las alteraciones metabólicas de este síndrome incluyen resistencia a la insulina, obesidad central, dislipidemia, hipertensión e intolerancia a la glucosa, ya sea por diabetes tipo 2 (T2D), tolerancia a la glucosa alterada o por niveles de glucosa en ayunas alterados. Este síndrome está englobado en el código 5A44 en la Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización mundial de la Salud (OMS) en su 11ª Revisión (ICD-11), donde se encuentran los síndromes de resistencia de la insulina [1].

El concepto de síndrome hace referencia a la concurrencia de estados clínicos que ocurren conjuntamente de manera más habitual de la que cabría esperar, mientras que el concepto metabólico hace referencia los procesos fisiológicos y bioquímicos que tienen lugar durante el normal funcionamiento del cuerpo. El concepto de MetS no fue aceptado internacionalmente hasta 1998 cuando la OMS estableció la definición del MetS [2]. Hasta ese momento, el MetS era conocido con nombres diferentes, como Síndrome X [3], Síndrome de resistencia a la insulina [4], Cuarteto mortal [5] o Síndrome de Reaven [6].

La extraña concurrencia de factores clínicos ya fue detectada por Kylin en 1920, cuando estudiaba la concurrencia de la hipertensión, hiperglucemia, gota e hiperuricemia [7]. En 1947, Vague notó que la obesidad parecía predisponer a la diabetes, arteriosclerosis, gota y cálculos y relacionó la acumulación de grasa central, típica en hombres, con problemas cardiovasculares [8]. En los años 70, se populariza el término MetS para describir los riesgos asociados con la diabetes. Así, cuando Haller describe los efectos aditivos de los factores de riesgo en la arteriosclerosis en 1977, emplea el término MetS para establecer una asociación entre la obesidad, diabetes mellitus, hiperlipoproteinemia, hiperuricemia

e hígado graso (esteatosis hepática) [9]. En el mismo año, Singer usa el término para la asociación entre obesidad, gota, diabetes, hipertensión e hiperlipoproteinemia [10]. Por su parte Phillips estableció que debía existir algún factor subyacente común a los factores de riesgo del infarto de miocardio, entre los que se encontraban las enfermedades cardiovasculares (CVD), la obesidad, alteración de los niveles de glucosa, edad, y otros estados clínicos, así como cambios en los niveles de hormonas sexuales [11]. Gerald Reaven propuso la resistencia a la insulina como el factor subyacente en esta constelación de anormalidades y lo denominó Síndrome X [3]. Contando con estas nomenclaturas, existen hasta 15 nombres distintos para la concurrencia de la resistencia a la insulina y los factores de riesgo para accidentes cardiovasculares [12].

#### i. Definiciones del MetS

Con el paso del tiempo, se han propuesto diferentes definiciones del MetS por parte de diferentes grupos expertos y organismos internacionales.

La primera de estas definiciones fue establecida en 1998 por la OMS [2]. Esta definición, estaba centrada en la resistencia a la insulina, por lo que establecía la presencia de diabetes mellitus, niveles anormales de glucosa o resistencia a la insulina como condición indispensable para ser diagnosticado por MetS. Además, la definición de MetS establecida por la OMS exigía la concurrencia de al menos dos de las siguientes condiciones: obesidad, dislipidemia, hipertensión o microalbuminuria.

Más tarde, el Grupo Europeo para el estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR), estableció su propia definición de MetS en 1999 [13]. Esta definición difería de la propuesta por la OMS en algunos valores de corte, como los de triglicéridos, así como por sustituir el índice de masa corporal (BMI) por el perímetro abdominal. Además, la definición de MetS propuesta por EGIR eliminaba la microalbuminuria como componente del síndrome y hacía la hiperinsulinemia un factor esencial del diagnóstico.

El Programa Nacional de Educación sobre Colesterol de Estados Unidos (NCEP), a través del Panel de Expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos (NCEP:ATPIII), estableció una nueva definición de MetS en el año 2001 [14], debido a la dificultad que entrañaba la evaluación de la resistencia a la insulina en la práctica clínica. Los cambios más importantes introducidos por el NCEP:ATPIII respecto a las definiciones anteriores eran el cambio de enfoque epidemiológico, ya que se pasaba de un enfoque centrado en la glucosa y su metabolismo a una colección de riesgos de CVD; y la medida de glucosa en ayunas, en lugar de la técnica de la pinza euglicémica hiperinsulinémica para determinar la resistencia a la insulina. En esta definición, la resistencia a la insulina o diabetes dejaban de ser condiciones necesarias para el diagnóstico de MetS [15] y se introducían nuevos valores de corte para el diagnóstico, basados en la población norteamericana, así como la obligación de cumplir con tres de ellos. El NCEP:ATPIII también daba recomendaciones de valores deseados de colesterol LDL y discutía la importancia del estado protrombótico y proinflamatorio como factores de riesgo de accidente cardiovascular [16].

En los años posteriores a la publicación del NCEP:ATPIII, surgieron nuevas definiciones para el MetS. La primera de ellas, de la Asociación Americana de Endocrinología Clínica (AACE), recuperaba la alteración en los niveles de glucemia como requisito para el diagnóstico de MetS. Además, incorporaba a la definición del MetS otros factores como la edad, la etnia, el historial familiar o los hábitos de vida; dejaba en manos del facultativo la elección de qué requisitos eran importantes para el diagnóstico, y volvía a introducir el BMI como valor de obesidad [17]. En 2005, el Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y la Sangre de la Asociación Americana del Corazón (AHA/NHLBI) publicó una modificación de los valores de la NCEP:ATPIII para ajustar los valores de obesidad según la etnia [18]. En el mismo año, la Federación Internacional de la Diabetes (IDF), publicó

su propia definición de MetS [19]. En la definición de MetS de la IDF, la obesidad abdominal era un requisito para el diagnóstico, aunque esta vez, se publicaron valores diferenciados para las distintas etnias y poblaciones del planeta. Además, esta definición estaba dirigida tanto a la práctica clínica como a la investigación, por lo que proporcionaba una lista de criterios adicionales que debían tenerse en cuenta en los estudios epidemiológicos y relacionados con el MetS [19]. Todas estas definiciones, pueden verse de forma comparada en la Tabla 1.



**Tabla 1. Comparación entre las distintas definiciones de MetS.**

		<b>EGIR, 1999</b>	<b>NCEP:ATP III, 2001</b>	<b>AACE, 2003</b>	<b>AHA/NHLBI NCEP:ATPIII, 2005</b>	<b>IDF, 2005</b>
<b>Requisito</b>	Diabetes, niveles anormales de glucosa en sangre en ayunas, tolerancia a la glucosa alterada o resistencia a la insulina. (medida en condiciones de hiperinsulinemia-euglucemia)	Resistencia a la insulina o hiperinsulinemia (valor en ayunas en el 25% superior para población no diabética).		Glucosa en sangre: En ayunas 110 - 125 mg/dL, tras una prueba de sobrecarga de glucosa (120 min 75g) 140 - 200 mg/dL		Obesidad abdominal: Valor ajustado según la etnia.
	Más 2 o más de los siguientes:	Más 2 o más de los siguientes:	3 o más de los siguientes:	Más alguno de los siguientes. Es una elección del médico.	3 o más de los siguientes:	Más 2 o más de los siguientes:
<b>Obesidad</b>	BMI >30 Kg/m <sup>2</sup> o relación cintura-cadera >0,9 (hombres) o >0,85 (mujeres).	perímetro abdominal ≥94 cm (hombres) o ≥80 cm (mujeres).	perímetro abdominal ≥102 cm (hombres), ≥88 cm (mujeres).	BMI >25 Kg/m <sup>2</sup> o perímetro abdominal ≥102 cm (hombres) o ≥88 cm (mujeres) Valores para no caucásicos 10-15% menores.	perímetro abdominal ≥102 cm (hombres), ≥88 cm (mujeres). En asiáticos, ≥90 cm (hombres) y ≥80 cm (mujeres).	

Tabla 1 (continuación). Comparación entre las distintas definiciones de MetS.

	OMS, 1999	EGIR, 1999	NCEP:ATP III, 2001	AACE, 2003	AHA/NHLBI NCEP:ATPIII, 2005	IDF, 2005
Dislipidemia	Triglicéridos $\geq 150$ mg/dL o colesterol HDL $< 35$ (hombres) o $< 39$ (mujeres) mg/dL	Triglicéridos $\geq 177$ mg/dL o colesterol HDL $< 39$ mg/dL	Triglicéridos $\geq 150$ mg/dL o colesterol HDL $< 40$ mg/dL (hombre), $< 50$ mg/dL (mujeres) o en tratamiento	Triglicéridos $\geq 150$ mg/dL o colesterol HDL $< 40$ mg/dL (hombre), $< 50$ mg/dL (mujeres)	Triglicéridos $\geq 150$ mg/dL o colesterol HDL $< 40$ mg/dL (hombre), $< 50$ mg/dL (mujeres) o en tratamiento.	Triglicéridos $\geq 150$ mg/dL o colesterol HDL $< 40$ mg/dL (hombre), $< 50$ mg/dL (mujeres) o en tratamiento.
Hipertensión	Presión sanguínea $> 140/90$ mm Hg	Presión sanguínea $> 140/90$ mm Hg o medicados	Presión sanguínea $> 130/85$ mm Hg o medicados	Presión sanguínea $> 130/85$ mm Hg o medicados	Presión sanguínea $> 130/85$ mm Hg o medicados	Presión sanguínea $> 130/85$ mm Hg o medicados
Otros	Microalbuminuria: ratio de excreción de albúmina $\geq 20$ $\mu\text{g}/\text{min}$ o ratio de albúmina/creatinina $\geq 30$ mg/g	Glucosa en ayunas $> 110$ mg/dL	Glucosa en ayunas $> 110$ mg/dL	Estilo de vida, edad, historial familiar, Síndrome de ovario poliquístico, etnia	Glucosa en ayunas $> 100$ mg/dL	Glucosa en ayunas $> 100$ mg/dL o Diabetes Mellitus

Debido a la existencia de tantas definiciones de MetS, existe una gran dificultad a la hora de comparar los resultados de las investigaciones para realizar estudios epidemiológicos y para diagnosticar a los pacientes [6], [15]. Por ejemplo, una persona con hiperglicemia, hipertrigliceridemia, y bajo colesterol HDL tendrá MetS si se usa la definición del NCEP:ATPIII, pero no con los criterios de la OMS, por no ser obesa. Por el contrario, una persona obesa, con insulina elevada y bajo colesterol HDL será diagnosticado con MetS con el criterio de la OMS, pero no por el criterio del NCEP:ATPIII [12], [20]. Por estos motivos, los representantes de las distintas organizaciones emprendieron la labor de unificar las diferencias para establecer unos criterios únicos para el diagnóstico y estudio del MetS. A este respecto, se acordó que la obesidad abdominal no debía ser un requisito obligatorio para el diagnóstico de MetS, pero que sí que sería uno de los cinco criterios que debían tenerse en cuenta. Además, se vio la necesidad de ajustar los perímetros abdominales según sexo y etnia, ya que la evidencia mostraba que no podía haber un único criterio para toda la población mundial [21]. El consenso final fue que la presencia de tres de los cinco factores de riesgo constituía un diagnóstico de MetS [15]. A continuación, se detallan los criterios unificados para el diagnóstico del MetS (Tabla 2):

**Tabla 2. Criterios unificados para el diagnóstico de MetS.**

<b>Medida</b>	<b>Valores Categóricos</b>
Perímetro abdominal elevado	Definiciones adaptadas a la población y el país (Tabla 3)
Triglicéridos elevados (el tratamiento farmacológico es un indicador alternativo <sup>†</sup> )	≥150 mg/dL
Bajo colesterol HDL (el tratamiento farmacológico para el HDL-C es un indicador alternativo <sup>†</sup> )	<40 mg/dL en hombres y <50 mg/dL en mujeres
Presión sanguínea elevada (El tratamiento con fármacos antihipertensivos es un indicador alternativo)	Sistólica ≥130 mm Hg Diastólica ≥85 mm Hg
Glucemia en ayunas elevada <sup>‡</sup> (el tratamiento farmacológico de la glucosa elevada es un indicador alternativo)	≥100 mg/dL
HDL-C indica lipoproteína colesterol de alta densidad.	
*Se recomienda que los valores de referencia IDF se usen para las poblaciones no europeas y que, tanto los valores IDF, como AHA/NHLBI se usen para poblaciones de origen europeo hasta que haya más evidencia científica disponible.	
† Los fármacos usados más comúnmente para triglicéridos elevados y bajos niveles de HDL-C son fibratos y ácido nicotínico. Puede entenderse que un paciente que tome alguno de estos fármacos tiene bajo HDL-C y niveles elevados de triglicéridos. Altas dosis de ácidos grasos ω-3 indican elevados niveles de triglicéridos.	
‡ Muchos pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tendrán MetS con el criterio propuesto.	

**Tabla 3. Valores de perímetro abdominal por etnia según los criterios unificados para el diagnóstico de MetS. Tabla extraída de Alberti y cols. [15].**

Población	Organización de la que se toma el valor de referencia	Valores recomendados de obesidad abdominal	
		Hombres	Mujeres
Europeos	IDF	≥94 cm	≥80 cm
Caucásicos	OMS	≥94 cm (riesgo elevado)	≥80 cm (riesgo elevado)
		≥102 cm (riesgo muy elevado)	≥88 cm (riesgo muy elevado)
Estados Unidos	AHA/NHLBI (ATP III)*	≥102 cm	≥88 cm
Canadá	Salud de Canadá	≥102 cm	≥88 cm
Europeos	Sociedades Cardiovasculares Europeas	≥102 cm	≥88 cm
Asiáticos (incluidos japoneses)	IDF	≥90 cm	≥80 cm
Asiáticos	OMS	≥90 cm	≥80 cm

**Tabla 3 (continuación). Valores de perímetro abdominal por etnia según los criterios unificados para el diagnóstico de MetS. Tabla extraída de Alberti y cols. [15].**

Población	Organización de la que se toma el valor de referencia	Valores recomendados de obesidad abdominal	
		Hombres	Mujeres
Japón	Sociedad Japonesa de Obesidad	≥85 cm	≥90 cm
China	Grupo de trabajo Cooperativo	≥85 cm	≥80 cm
Mediterráneo Medio-orientales	IDF	≥94 cm	≥80 cm
Africanos Subsaharianos	IDF	≥94 cm	≥80 cm
Etnias de América Central y Sud-América	IDF	≥90 cm	≥80 cm
<p>*Las recomendaciones recientes de AHA/NHLBI para el MetS reconocen un riesgo elevado de enfermedad cardiovascular y diabetes con valores de perímetro abdominal ≥94 cm en hombres y ≥80 cm en mujeres y los identifica como valores opcionales para individuos o poblaciones con resistencia a la insulina.</p>			

ii. MetS en el mundo y enfermedades relacionadas

Desde que se introdujo el concepto de MetS, se han publicado más de 100 mil artículos científicos relacionados con el síndrome e incluso han surgido diversas revistas especializadas, como *Journal of Metabolic Syndrome, Diabetology & Metabolic Syndrome, Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity, Diabetes and Metabolic*

*Syndrome: Clinical Research and Review* o *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, mostrando el gran interés que hay en el mundo científico por este síndrome.

Este gran interés en el MetS se justifica por el aumento exponencial de personas que sufren el propio síndrome, unido al gran aumento de la obesidad y la diabetes en el mundo, llegando a adquirir niveles pandémicos. De hecho, se estima que el MetS se puede convertir en un gran problema de salud pública, superando a las CVD y la diabetes e incluso al tabaco como causa de accidentes cardiovasculares [22]. De hecho, el MetS se asocia con cinco veces más riesgo de sufrir T2D, dos veces más desarrollar CVD y 1,5 veces más riesgo en el resto de causas mortales [16], [21], [23], [24], [25], [26], [27], [28].

El gran aumento de pacientes con MetS se debe al gran aumento de la obesidad y la diabetes, enfermedades con las que guarda una estrecha relación [6], [29]. Además, la adopción en los países desarrollados de estilos de vida sedentarios y el elevado consumo de comida barata y altamente calórica están haciendo crecer las tasas de prevalencia hasta niveles altamente preocupantes. De hecho, se estima que la obesidad se ha triplicado en más de 70 países desde 1980 [30], [31] y que afectará a más de 300 millones de personas en el mundo en 2030 [30], aunque otros autores estiman que más del 80% de la población mundial sufrirá obesidad para ese año [20]. En cuanto a la diabetes, se ha acuñado el término “diabesidad” [32] para alertar de la relación entre T2D, obesidad y trastornos metabólicos; y se estima que la combinación de obesidad y diabetes afectará a 700 millones de personas en el mundo para el año 2045 [33]. Todas estas previsiones podrían verse empeoradas en un futuro debido al impacto de la COVID-19, ya que el cierre de escuelas y de la población en sus casas por largos periodos de tiempo podría haber aumentado los niveles de obesidad infantil y de adolescentes, así como de T2D [34], ya de por sí bastante preocupantes. En España, un estudio determinó que la obesidad infantil

en niños entre 6 y 9 años estaba cercana al 25% [35], valores similares a los hallados en niños entre 6-9 años en 12 países europeos por la OMS [36]. Datos que empeoraron dos años después, cuando la prevalencia llegó hasta el 50% en algunos casos [37].

En este contexto, las estimaciones de prevalencia del MetS no son más halagüeñas. Por ejemplo, se estima que en los países del Golfo Pérsico la prevalencia del síndrome es cercana al 40% de la población [38], y en Corea se estima que los adolescentes con MetS son más del doble entre los chicos que entre las chicas [34]. En Estados Unidos, más de un tercio de la población estadounidense sufre MetS, independientemente de su nivel sociodemográfico [39], [40], [41], alcanzándose valores de más del 50% en ancianos [42]; no muy lejos del 40% estimado en la población China adulta [43]. En el resto del mundo los números no mejoran: en Europa, la estimación de incidencia del MetS se sitúa en un rango entre el 20 y el 46% de la población adulta; en Asia entre el 18 y el 36%; y en América Latina el rango se sitúa entre el 14 y 53% de la población [23], llegándose a producir aumentos hasta alcanzar el 53% de la población mundial [20]. Además, la contaminación ha sido señalada por tener una relación directa con el desarrollo del síndrome [44].

Estos datos deberían hacernos reflexionar sobre la importancia del MetS y del aumento de la mortalidad y morbilidad que causa, juntamente con el aumento de recursos económicos necesarios para hacer frente a este síndrome y las enfermedades relacionadas. Entre las patologías con las que se ha relacionado el MetS podemos encontrar diversos tipos de cáncer [45], como el cáncer de piel [46] o próstata [47]; cirrosis, esteatosis hepática no alcohólica e hígado graso no alcohólico [48]; soriasis y acné [46]; apnea obstructiva del sueño [49]; hipogonadismo y síndrome de ovarios poliquísticos [50], [51]; daños renales [52]; trastornos bipolares y esquizofrénicos [53], [54]; demencia [55]; VIH [56] o hipopituitarismo [57].



### iii. Fisiopatología

Hoy en día, no está clara cuál es la causa raíz del MetS o si alguno de los síntomas (dislipidemia, diabetes, resistencia a la insulina u obesidad) es la causa subyacente que dispara el MetS. Esto se debe a que la fisiopatología del MetS es altamente compleja, ya que intervienen numerosos sistemas y moléculas, al tiempo que existen muchas variables que condicionan la aparición de este síndrome, como la edad, la etnia, el sexo, la genética y el estilo de vida.

En las últimas décadas, el cambio en el estilo de vida de la población ha provocado un aumento del consumo de alimentos ricos en grasas y densamente calóricos, al tiempo que ha estimulado hábitos de vida más sedentarios, con lo que tenemos un exceso de energía. Cuando ingerimos alimentos, los nutrientes son absorbidos a través del intestino y pasan al torrente sanguíneo, para ser llevados a los tejidos y células donde van a ser consumidos. En este proceso, la leptina y la insulina juegan un papel muy importante. La leptina regula el apetito y la secreción de insulina en el organismo [58], mientras que la insulina estimula el consumo de glucosa por parte de los músculos, la síntesis de proteínas y glicógeno en hígado y músculos, y la síntesis y almacenamiento de lípidos por parte del tejido adiposo; al tiempo que detiene la oxidación de ácidos grasos libres y regula la glucogenólisis y la gluconeogénesis [25].

Si hay un exceso de glucosa en el plasma, aumenta la cantidad de insulina en circulación que, a través del receptor de insulina mueve el transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática para almacenar el exceso de azúcar en forma de grasa en el tejido muscular y los órganos [59], formando el tejido adiposo subcutáneo y visceral, respectivamente. El tejido adiposo, formado por adipocitos, es un órgano metabólicamente activo, aunque presenta diferencias entre el tejido adiposo subcutáneo y el tejido adiposo visceral (VAT) [20], [60], [61], [62]. Entre otras funciones, el tejido

adiposo regula la temperatura corporal, el apetito, la acumulación de grasa y la secreción de numerosas sustancias [63], como la leptina, adiponectina, resistina, visfatina, proteína quimioatrayente de monocitos 1, unión de retinol proteína 4, proteína de unión a ácidos grasos de tipo adipocito, angiotensina II, factor activador de plasminógeno 1 (PAI-1) y citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleuquina 6 (IL-6) [16], [64], además de ácidos grasos libres (FFA).

La acumulación de tejido adiposo produce hipertrofia del tejido adiposo y una mayor secreción de sustancias por parte de los adipocitos, causando resistencia a la leptina en el organismo y un estado proinflamatorio. Con el tiempo, los adipocitos se vuelven fibróticos debido a la inflamación crónica producida por las citoquinas proinflamatorias (adiposopatía), que reduce la secreción de adiponectina y aumenta la producción de citoquinas y la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo [6], [65]. A su vez, este aumento de tejido adiposo también hace que haya mayor cantidad de FFA circulando en el torrente sanguíneo, que son metabolizados en el hígado para ser transformados en triglicéridos y glucosa. Debido al exceso triglicéridos, estos se unen al colesterol, a la proteína apo-B y se forman abundantes lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que son secretadas por el hígado, produciendo hipertrigliceridemia. Estas VLDL son transformadas por acción de la lipoproteína lipasa y la proteína transferidora de ésteres de colesterol, que toma triglicéridos de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) para formar lipoproteínas de baja densidad (LDL) [66], [67]. El LDL formado, debido a su baja densidad, se acumula en las paredes de los vasos sanguíneos [68], que unido al efecto trombótico de las citoquinas proinflamatorias produce hipertensión. Además, el aumento de FFA en circulación y la reducción en la secreción de adiponectina reduce el efecto de la insulina en los tejidos periféricos y aumenta la gluconeogénesis y la actividad de la lipasa en el hígado, aumentando los FFA disponibles y magnificando el problema [16].

La reducción del efecto de la insulina en los tejidos periféricos es lo que se conoce comúnmente como Resistencia a la Insulina (RI). Con la RI y el aumento de gluconeogénesis por parte del hígado, aumenta la cantidad de glucosa en circulación, y las células beta se ven obligadas a aumentar la secreción de insulina para conseguir controlar los niveles de glucosa en sangre. Este aumento de producción de insulina se produce, en parte, por un aumento del tamaño de las células beta, que unido a la acumulación de FFA en el interior de las células produce mucho estrés en el retículo endoplasmático (ER) y en las mitocondrias. Debido a este estrés, se secretan numerosas citoquinas proinflamatorias por parte de la célula  $\beta$ , aumentando el estado de inflamación y estrés oxidativo general, y en el caso de la célula beta, llegando a causar apoptosis [69], [70], [71], lo que agrava la hiperglucemia, la dislipidemia y la hipertensión y desemboca en T2D, uno de los síntomas más característicos del MetS.

Como consecuencia de la muerte de las células beta, se produce hiperglicemia e hipertensión, ya que la insulina, además de estar involucrada en el control de la glucosa, también tiene efecto vasodilatador. Además, con la resistencia a la insulina aumenta la producción de adipoquinas hipertensivas (como la leptina y la resistina) y se reduce la producción de óxido nítrico (NO) endotelial, contribuyendo a la prevalencia de la hipertensión [22], [67]. Debido a la hiperglucemia mantenida en el tiempo, también pueden formarse productos finales de glicación avanzada (AGE) que se unen a diversas proteínas, cambiando su forma y afectando a su función. Además, los AGE se pueden unir al receptor AGE desencadenando procesos inflamatorios, angiogénesis, fibrosis e incluso pérdida de la elasticidad de los tejidos, contribuyendo al fallo cardíaco [72].

Además de todas estas señales, hay que tener en cuenta que en todo este complejo entramado juegan otras variables como los exosomas y microRNA, que actúan de mensajeros de larga distancia entre los distintos sistemas y células y posibilitan la

regulación de algunos procesos [73]. Además, parece claro que existe algún tipo de predisposición genética, ya que no todos los pacientes con hiperglucemia desarrollan T2D.

#### iv. Tratamiento del MetS

Como se ha indicado anteriormente, y a la vista de las definiciones más importantes, los factores de riesgo del MetS más significativos incluyen la resistencia a la insulina, obesidad abdominal, presión sanguínea elevada, glucemia basal elevada y valores de lípidos anormales. Además de estos factores, también es importante considerar el efecto que tienen en el desarrollo de estos síntomas factores como la edad, la etnia, el historial familiar, el estilo de vida sedentario o hábitos como el tabaquismo, mala alimentación, los patrones de sueño o el alcoholismo [6], [22], [31], [71], [74].

Con la prevalencia mundial de MetS actual y el aumento de casos de diabetes de tipo 2 y de obesidad en el mundo, el tratamiento y detección tempranos del síndrome se convierten en un imperativo moral, médico y económico para prevenir la aparición del MetS y sus efectos más nocivos. Debido a que el MetS es una enfermedad compleja cuya fisiopatología no termina de estar bien resuelta, una aproximación muy habitual para tratar el MetS es el tratamiento individual de las componentes del síndrome y la reducción de los riesgos asociados [75]. El tratamiento más recomendado para el MetS es realizar un cambio contundente en los hábitos de vida: perder peso (se aconseja perder alrededor del 10% del peso corporal durante el primer año), realizar ejercicio regular, dieta sana, dejar de fumar, reducir la presión sanguínea, mejorar el colesterol e intentar controlar los niveles de glucemia en sangre [16], [19], [22]. En los casos más graves, en que los cambios de estilo de vida no surjan efecto, puede aplicarse tratamiento farmacológico [22].

Debido a que la obesidad es uno de los factores más asociados al MetS [6], [20], [76], y que las variaciones de la grasa visceral han sido asociados a variaciones en marcadores de inflamación, insulina, péptido-c e inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) [77], el tratamiento de la obesidad ha sido uno de los focos de acción para tratar el MetS ya que, en muchos casos, es debida a factores como el exceso de calorías y la falta de actividad física [78].

Distintos estudios han tratado de mejorar los hábitos de alimentación de los pacientes introduciendo diversas dietas, alimentos concretos o complementos, reduciendo el uso de comida ultra procesada, relacionada con mayores niveles de obesidad, diabetes y MetS [79]. Así, diversos autores han probado el uso de diversas dietas, aunque no hay un acuerdo respecto al tipo de dieta más apropiada para perder peso y mejorar los efectos del MetS, siendo muy pequeña la diferencia de pérdida de peso entre algunas de ellas [29].

Entre las dietas usadas, se han aplicado la dieta mediterránea y las recomendaciones nutricionales para parar la hipertensión (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*, DASH) en pacientes con MetS, dónde se disminuyó el peso de los pacientes y se mostraron las ventajas de estas dietas en la prevención del MetS, la diabetes y la hipertensión [31], [80], [81], [82]. Bravata y cols [83] señalan que las dietas bajas en carbohidratos no producen cambios significativos en los niveles de glucosa y lípidos en sangre ni en el peso de los participantes, aunque por su parte Chung y Rhie afirman que las dietas altamente proteicas con restricciones de grasas y carbohidratos y las dietas complementadas con ayuno sí producen pérdida de peso, aunque no sirven para modificar los parámetros del MetS [34].

Por su parte, el uso de complementos dietéticos no farmacológicos como el uso de tes, chocolate, aceite de oliva virgen, vino tinto, frutas ricas en polifenoles (como las fresas), verdolaga, probióticos, vitamina D, omega-3, cúrcuma, etc. también han sido probadas

para tratar el MetS y sus efectos [16], [31], [84], [85], [86], [87]. Se cree que la acción de estos alimentos puede estar relacionada con la presencia de compuestos como los polifenoles, que mejoran la respuesta inmune e inflamatoria, mejorando la respuesta a la insulina y los efectos del estrés oxidativo [85], [86]. O por su efecto beneficioso para la microbiota intestinal y la inflamación sistémica [87].

El otro pilar en el que se fundamenta el tratamiento de la obesidad y algunas patologías relacionadas, es la batalla contra el sedentarismo y la falta de actividad física. Entre otros beneficios, la actividad física habitual ha demostrado tener una relación inversa con el MetS [88], [89]. Además, la actividad física habitual se ha relacionado con niveles menores de colesterol, presión sanguínea, glucemia, grasa visceral, inflamación sistémica y mayor sensibilidad a la insulina [31], [71], [88]. A pesar de la coincidencia en los beneficios de practicar deporte, no hay un consenso respecto a qué tipo de ejercicio es mejor, ya que es difícil comparar entre los distintos estudios debido a la variedad de tiempos e intensidades [71].

En casos muy severos, en que los cambios de hábitos de vida no surgen efecto, se opta por aplicar tratamientos farmacológicos para tratar el MetS. Estos tratamientos, que pueden ser polifarmacológicos, se basan principalmente en tratar las distintas patologías relacionadas, centradas principalmente en reducir el riesgo cardiovascular y el tratamiento de la diabetes [90]. Así, es frecuente el uso de drogas antihiper glucémicas como la insulina basal, inhibidores de la alfa-glucosidasa o la metformina, un biguanido que previene el aumento de peso y disminuye los niveles de glucosa en sangre [31], [34], [71], [90]; y fármacos del grupo de las tiazolidinedionas, que aumentan la sensibilidad a la insulina de las células [91], [92]. Otros agentes terapéuticos que también han sido probados para tratar la obesidad y el MetS son los inhibidores de lipasas y suplementos de Coencima-Q10 [34], [93], así como secuestradores de ácido bílico e inhibidores de la

absorción de colesterol, como las estatinas (inhibidores de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA)) para disminuir los niveles de colesterol LDL [16] e hipotensivos [16], [23], [90].

A parte de las formas mencionadas a lo largo de esta sección para tratar el MetS, otras alternativas han sido publicadas en revistas científicas. Así, el equipo de Cota-Coronado señala los beneficios de la tecnología de células madre pluripotenciales inducidas (del inglés iPSC) en el tratamiento de desórdenes metabólicos para reprogramar células beta funcionales y las posibilidades de tratamientos celulares específicos [94]. En la misma línea también se ha propuesto el uso de exosomas-microRNA para detectar de manera precoz disfunciones metabólicas, así como para tratar los síntomas [73]. Los exosomas actúan como reguladores del desarrollo de la diabetes y la sensibilidad a la insulina y diversos tipos de micro RNA han sido relacionados con la disfunción de células  $\beta$ , como miR-223 y miR-103 [73]. Estos exosomas podrían ser transferidos a otros tejidos para mejorar la acción de la insulina sobre ellos y tratar así la hiperglicemia y resistencia a la insulina. Otros autores han apuntado a la cirugía bariátrica como medio para reducir el peso del paciente, reducir la adiposidad visceral y mejorar patologías relacionadas como el hígado graso no alcohólico, la diabetes y el MetS [71], [95].

#### v. Controversias relacionadas con el MetS

Algunos investigadores han cuestionado la utilidad del MetS o incluso su existencia debido a que consideran que agregarlos bajo un síndrome aporta poco a la clínica [23], [96], ya que no predice el riesgo cardiovascular mejor que la suma de los riesgos derivados de sus componentes. Si tenemos en cuenta que en medicina un síndrome es una agrupación de factores clínicamente relevantes que concurren con más frecuencia de la esperada por simple probabilidad, entonces podemos considerar correcta la existencia del MetS, debido a que la concurrencia de los factores de riesgo metabólico (diabetes,

dislipidemia, hipertensión y obesidad) es un fenómeno común y real. Además, el diagnóstico de MetS se usa como herramienta para predecir el riesgo de enfermedad cardiovascular, T2D y visualizar la necesidad de disminuir estos riesgos por parte de los pacientes y médicos, implantando acciones correctivas como cambios en los hábitos de vida.

Entre las críticas más destacadas contra el concepto de MetS, se encuentran las referentes a las distintas definiciones del síndrome manejadas por los distintos organismos. Así, un paciente con hiperglicemia, hipertrigliceridemia y colesterol HDL bajo sería diagnosticado de MetS según ATPIII, pero no según los criterios de la WHO [12], [20]. Esto ha sido subsanado en parte por la unificación de las distintas definiciones en una sola, pero esta definición no es perfecta y olvida algunos de los factores más importantes para la predicción del riesgo de accidente cardiovascular como son el tabaquismo, el sexo o la edad del paciente [16], [71]. Además, esta definición no está bien adaptada para niños y adolescentes, donde diferentes autores han propuesto sus adaptaciones, incluida la propia IDF [12], [97], [98], [99]. Aun así, el MetS continúa usándose como indicador de riesgo cardiometabólico gracias al uso de algoritmos como REGICOR o Framingham, que incorporan los factores que no incluye la definición de MetS [75].

En cuanto a los tratamientos, si bien los tratamientos basados en exosomas e iPSC son tratamientos novedales en fases de experimentación y bastante caros, el resto de los tratamientos arriba descritos no están exentos de problemas. Así, los cambios de estilo de vida, tanto para aumentar la actividad física o cambiar los hábitos de alimentación, resultan difíciles de mantener a largo plazo y están sujetos a altos niveles de abandono [71], llegando a desaparecer los efectos de pérdida de peso en muchos casos en apenas un año [29]. Este abandono del tratamiento no se circunscribe únicamente al caso del cambio de hábitos, ya que podría ser comprensible debido a la gran fuerza de voluntad necesaria



para llevarlos a cabo, sino que también se da en los tratamientos farmacológicos, que están sometidos a bajo seguimiento por los pacientes, efectos secundarios e interacciones entre fármacos [90]. En cuanto a los tratamientos quirúrgicos, cabe señalar que estos pueden tener consecuencias en otros sistemas, como diarreas y otros daños colaterales [95]. Además, tanto las cirugías como los tratamientos farmacológicos tienen un alto coste económico y eficacia limitada [100], [101].

#### vi. Diabetes y MetS

Existe una estrecha relación entre el MetS y la diabetes. Se calcula que aproximadamente un 85% de pacientes con T2D cumple los criterios de diagnóstico del MetS [22], ya que hay correlación entre el perímetro de cintura y la hemoglobina glicosilada HbA<sub>1c</sub> [102], e incluso puede considerarse el MetS como un predictor de diabetes futura [6].

La diabetes es un síndrome clínico caracterizado por elevados niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia) y la incapacidad del cuerpo para regular la hiperglucemia por un déficit en la acción de la insulina. La diabetes es un desorden metabólico cuyos síntomas típicos son la poliuria, polidipsia, pérdida de peso, alteración del metabolismo de proteínas y lípidos y, en ocasiones, polifagia y mayor susceptibilidad a procesos infecciosos; mientras que las complicaciones a largo plazo de esta enfermedad son la neuropatía, la retinopatía, nefropatía, macroangiopatía y úlceras en las extremidades (pie diabético) [70], [73], [103], [104].

Según la publicación *Standards of Care in Diabetes 2023* de la *American Diabetes Association* [105], podemos distinguir cuatro tipos de diabetes:

- Diabetes tipo 1: Debida a la destrucción autoinmune de células  $\beta$ . Normalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina.

- Diabetes tipo 2 (T2D): Debida a la pérdida progresiva de secreción de insulina por parte de las células  $\beta$ . Esta pérdida no se debe a efectos autoinmunes y generalmente está relacionada con un trasfondo de MetS o resistencia a la insulina.
- Diabetes debida a otras causas: Generalmente debido a síndromes diabéticos monogénicos, como la diabetes neonatal; enfermedades pancreáticas, como la pancreatitis y fibrosis quística; y la diabetes inducida por fármacos, como la diabetes producida por glucocorticoides usados después de trasplantes de órganos y tratamiento de VIH.
- Diabetes gestacional: diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo que no se manifestaba antes de la gestación.

Además de estas clasificaciones también existe la “diabetes doble”, un tipo de diabetes que sufren los pacientes de diabetes tipo 1 que presentaban resistencia a la insulina y características de la T2D, en el contexto del MetS [29].

En nuestro caso nos centraremos en la T2D, ya que la aparición de la T2D está relacionada con diversos factores como la obesidad, la falta de actividad física, factores genéticos, inflamación y alteraciones en el metabolismo de lípidos y proteínas, todos ellos relacionados con el MetS [106], [107]. Además, aunque se pensaba que la T2D era cosa de adultos ya que es una de las enfermedades crónicas más comunes entre los ancianos [108], con el aumento de la obesidad en la infancia y adolescencia, han aumentado los diagnósticos de T2D y MetS en la niñez [6].

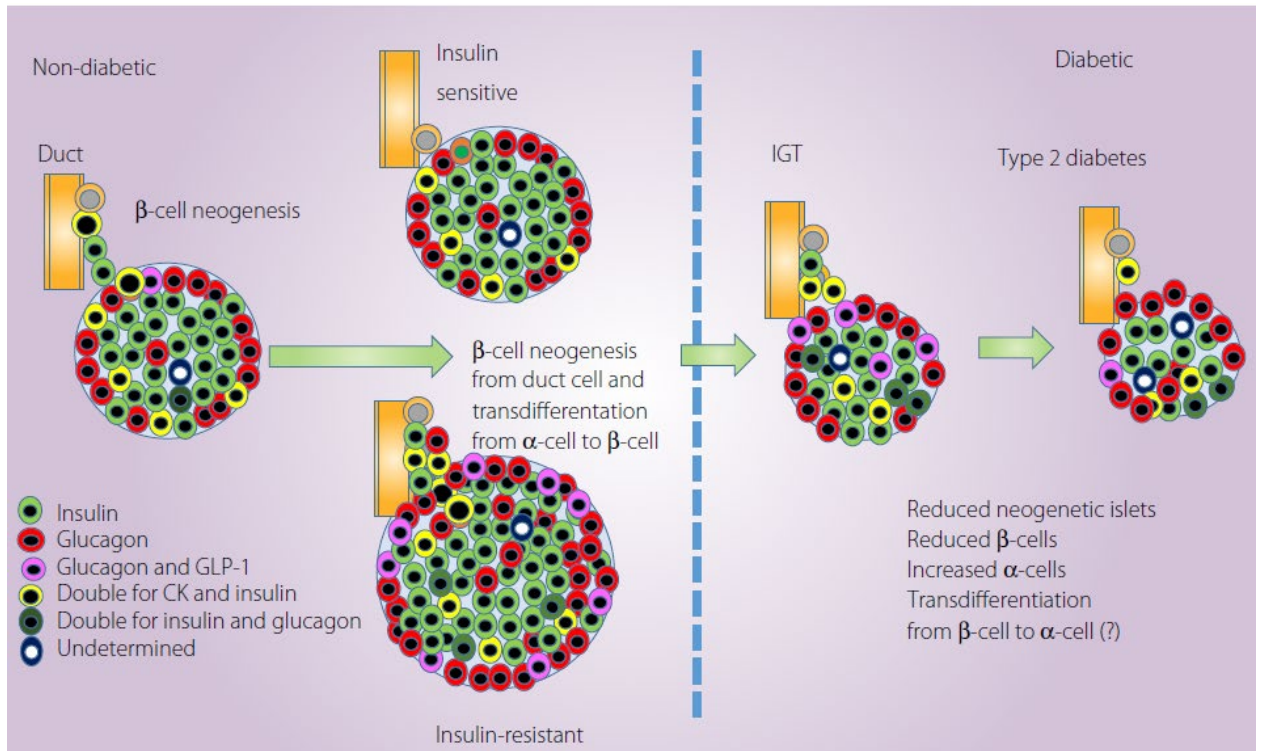
La etiología de la T2D es la resistencia a la insulina, que es un polipéptido con funciones endocrinas secretado por los islotes de Langerhans del páncreas, que también producen el glucagón. Los islotes de Langerhans a su vez pueden subdividirse en células  $\alpha$  y  $\beta$ . Las células  $\alpha$ , se encuentran principalmente en la zona exterior de los islotes y son las

encargadas de secretar el glucagón para estimular la producción de glucosa en el hígado mediante el uso de glucógeno para convertirlo en glucosa, en un proceso llamado glucogenólisis, y en los adipocitos con la gluconeogénesis a partir de triglicéridos. A su vez, las células  $\beta$  se distribuyen en el área central de los islotes de Langerhans y secretan insulina para la utilización de la glucosa en los tejidos, reducir los niveles de glucosa en sangre y la señalización y regulación de otros procesos, como el metabolismo de lípidos, el sistema cardiovascular o el sistema nervioso central, afectando a la cognición, el aprendizaje y la memoria [109].

Debido al déficit de acción de la insulina por la resistencia al efecto de los niveles normales de insulina por parte de las células, las células  $\beta$  aumentan la producción de insulina conduciendo a una situación de hiperinsulinemia para mantener la homeostasis de la glucosa. Con el tiempo, esto resulta en agotamiento de las células  $\beta$  y a una hiperglucemia crónica. Este agotamiento de las células beta, unido al estrés oxidativo y la inflamación sería la causa de apoptosis de las células  $\beta$  [93], [110], [111], [112].

En pacientes obesos no diabéticos, se ha observado un aumento de la densidad de células  $\beta$  [113], lo que permite al páncreas aumentar la secreción de insulina y compensar el déficit de acción durante el estado prediabético. Pero, a su vez, la población y el tamaño de las células beta es prácticamente estable a lo largo de la vida [114], por lo que los datos entrarían en contradicción. Esta contradicción parece haber sido resuelta mediante la llamada transdiferenciación de las células endocrinas [115]. Según esta teoría propuesta por Mezza y colaboradores [116], el aumento de la población de células  $\beta$  se produce por una transdiferenciación de células  $\alpha$  y por células provenientes del ducto pancreático (Figura 1). Debido a la situación de estrés a la que está sometida la célula, cuando ésta no es capaz de compensar el déficit de acción de la insulina se produce la supresión del factor de transcripción FOXO1 y produce la diferenciación de las células  $\beta$  a  $\alpha$ , produciéndose

el paso al estado diabético. Esta teoría se ve reforzada con los hallazgos de otras investigaciones muestran que en autopsias a pacientes diabéticos se ha encontrado un aumento de la proporción de células  $\alpha$  en relación con pacientes no diabéticos y que la proporción de aumento de células  $\alpha$  sería similar a la reducción en la población de células  $\beta$  [117], [118].



**Figura 1. Transdiferenciación de células pancreáticas (Extraída de Yaguihashi [119]).**

Las células beta del páncreas secretan insulina como respuesta a un aumento de la concentración de glucosa en sangre. Al aumentar la concentración de glucosa, la glucosa es detectada por las glucoquinasas (GCK), que son unas proteínas que se encuentran en las membranas de las células  $\beta$  y actúan como receptores de la glucosa. Cuando ésta es detectada, es transportada hacia el interior de las células  $\beta$  mediante el transportador de glucosa GLUT2, promoviendo la glicólisis y formación de piruvato, que una vez en la mitocondria, alimenta el ciclo del ácido tricarbólico (TCA). El TCA induce la transferencia de electrones en la cadena respiratoria a través del NADH, donde finalmente

se produce adenosín trifosfato (ATP) y aumenta la ratio intracelular ATP/adenosín difosfato (ADP) con el ATP producido por el metabolismo de la glucosa en la mitocondria [111], [120]. El aumento de la ratio ATP/ADP produce un cambio en la polaridad de la membrana celular, bloqueando el canal de potasio dependiente del ATP ( $K^+_{ATP}$ ) y activando los canales de calcio ( $Ca^{2+}$ ), estimulando el flujo de  $Ca^{2+}$  intracelular. El aumento de la cantidad de  $Ca^{2+}$  intracelular estimula la exocitosis y, por tanto, la secreción de insulina en las células  $\beta$  [84], [121].

La acción de la insulina en las células fluye a través de dos vías principales de señalización: la vía PI3K/Akt o vía de la fosfatidinositol-3-quinasa, responsable de los efectos metabólicos y la vía MAPK/Ras o de quinasas activas por mitógeno/Ras, que regula la expresión genética de la insulina. Cuando la insulina es captada por los receptores de insulina IRS1 y IRS2, debido a la fosforilación de estos receptores, se inicia la propagación de las señales de la insulina. La vía PI3K/Akt produce como resultado la traslocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana celular, aumentando la captación de glucosa en las células del músculo esquelético y tejido adiposo, aliviando la hiperglucemia. Además, esta vía inactiva la FOXO1 del hígado, que es la causante de la gluconeogénesis en el hígado [25], [109]. Cuando se inhibe la fosforilación de estos receptores, se inactiva la ruta PI3K/Akt y se prolonga la activación de la vía MAPK/Ras, promoviendo la mitogénesis y el sobrecrecimiento, generando obesidad y un aumento de la glucosa en sangre, ya que el FOXO1 sigue activo y, por tanto, continúa la gluconeogénesis en el hígado [25], [71], [109].

Aunque las causas de la resistencia a la insulina aún no han sido completamente elucidadas, diversas revisiones coinciden en señalar como causas al estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplasmático de las células  $\beta$ , la falta de fosforilación de los residuos de tirosina de los receptores IRS, la inflamación sistémica y la activación de los receptores

Toll-like (TLR), especialmente los TLR-2 y 4 que aumentan la expresión de citoquinas proinflamatorias [25], [71], [109].

El tratamiento más común para la T2D son las inyecciones de insulina, combinadas con cambio de los hábitos de vida, principalmente cambios en la dieta y ejercicio físico.

#### vii. MetS y sistema nervioso central

El cerebro es uno de los órganos más complejos del cuerpo humano y nos permite procesar información, emociones, realizar movimientos y guardar recuerdos. Situado en la cabeza, forma parte del sistema nervioso central (SNC), junto con la médula espinal. El cerebro está formado por millones de neuronas y se divide en diversas partes, entre las que podemos destacar el hipocampo, la corteza prefrontal y el hipotálamo, relacionadas con el almacenamiento de la memoria, la captación de información y el metabolismo, respectivamente.

En lo que se refiere a la capacidad de recordar y almacenar memoria, el cerebro procesa mediante procesos distintos en la corteza cerebral la información recibida de qué ocurre y donde ocurre. Posteriormente, en el lóbulo medio temporal, estas señales convergen para terminar su camino en el hipocampo, donde se procesa esta información y se forma la memoria a largo plazo. Por otro lado, la memoria a corto plazo es procesada y almacenada por la corteza.

Por su parte, el hipotálamo es la zona del SNC que regula el metabolismo y el consumo de energía en el cuerpo, mediante el reconocimiento de la leptina por neuronas sensibles a esta hormona. Algunos estudios han demostrado que cambios en el estado inflamatorio y la autofagia del hipotálamo juegan un papel importante en el envejecimiento y la esperanza de vida, así como en la aparición de las componentes del MetS, como el

sobrepeso, la hipertensión y la intolerancia a la glucosa; en un proceso regulado por las citoquinas IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$ B [122], [123].

Por tanto, teniendo esto en cuenta, el estrés oxidativo a nivel del sistema nervioso central podría estar relacionado en el desarrollo del MetS. De hecho, el SNC es altamente susceptible al estrés oxidativo debido a la gran cantidad de oxígeno y ATP que utiliza para llevar a cabo sus funciones [124]. Además, la sobrenutrición y la obesidad se han relacionado con estrés oxidativo, degeneración neuronal y desajustes cognitivos en roedores [125], [126], así como la activación de las distintas vías de señalización de los TLR, favoreciendo la aparición del MetS, la resistencia a la insulina y la leptina, obesidad y T2D [127].

Cabe señalar que, parte de este estrés oxidativo en el cerebro está causado por la resistencia a la insulina, cuya acción en el cerebro ha sido relacionada con daños a la función y supervivencia de oligodendrocitos, lo que reduce la integridad de la mielina, aumentando la neuroinflamación y la neurodegeneración, y afectando a la función de los neurotransmisores y a la plasticidad del cerebro, así como a la memoria y el aprendizaje [128].

## b. EL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO

El consumo de bebidas alcohólicas es una práctica social muy común en muchas culturas y religiones del mundo que, además, produce desinhibición y placer a quien lo consume. Por eso no es de extrañar que aproximadamente el 43% de la población mundial mayor de 15 años consuma esta sustancia; valor que aumenta hasta el 60% en la población europea, donde se registran mayores tasas de consumo habitual [129].

Aunque el consumo a nivel mundial sea elevado y sea una característica común de muchas culturas, las bebidas alcohólicas no se consumen igual en todo el mundo. Así, mientras que la forma más consumida mundialmente es en forma de bebidas espirituosas, en Europa el 70% del alcohol consumido lo hace en forma de vino y cerveza [129].

Del mismo modo que no se consumen los mismos tipos de bebidas alcohólicas en todo el mundo, tampoco la forma de consumirlo es igual entre todas las personas, pues podemos diferenciar dos tipos de consumo de alcohol etílico:

- Consumo moderado: Consumo de bebidas alcohólicas por debajo de 10-12g de alcohol etílico al día para mujeres y de 20-24g de alcohol etílico para hombres [130]. Es decir, más o menos una bebida al día, aunque hay cierta discusión respecto a esta definición.
- Abuso del consumo de alcohol etílico: En este caso se habla de un consumo superior a 60g de alcohol etílico en una única ocasión, al menos una vez al mes. Europa es la zona con un mayor porcentaje de población que presentan este tipo de consumo, un 26,4% en 2016, según el observatorio de la OMS [129], [131].

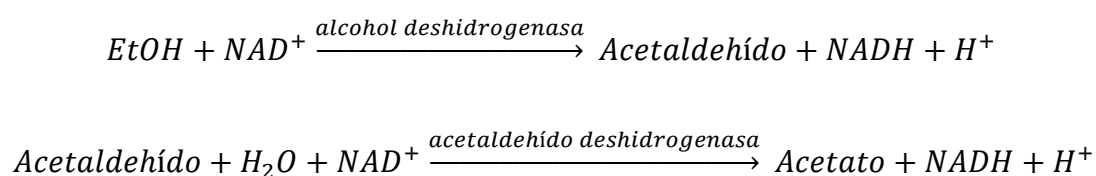
A pesar de que se estima que el consumo de alcohol etílico a nivel mundial se reduzca del 43 al 40% para el año 2025, el aumento de la población mundial que se producirá en el mismo intervalo hará que haya cerca de 107 millones de bebedores más en 2025 que en



2016, cuando se realizó el estudio [129]. Este motivo, unido al hecho que aproximadamente un 5% de las muertes que se producen en el mundo pueden ser atribuidas al consumo de alcohol etílico, provoca que exista una elevada preocupación por los organismos oficiales por los efectos que causa el alcohol etílico en la salud.

#### i. Metabolismo del alcohol etílico

El alcohol etílico se ingiere de forma habitual por vía oral, es absorbido en el tracto intestinal y metabolizado en su mayor parte por el hígado, mediante vías oxidativas y no oxidativas. La vía oxidativa, es la vía principal de metabolismo del alcohol etílico en el hígado y está compuesta por dos etapas (Figura 2): en la primera, la enzima alcohol deshidrogenasa convierte el alcohol etílico en acetaldehído [132], una molécula altamente reactiva y tóxica; mientras que, en la segunda etapa, el acetaldehído es a su vez transformado en acetato a través de la enzima acetaldehído deshidrogenasa [112], [131], para después ser excretado en forma de CO<sub>2</sub>, ácidos grasos y agua. Tal y como puede verse en las reacciones de oxidación del alcohol etílico (Figura 2), la oxidación del alcohol etílico por parte de las mitocondrias de los hepatocitos hasta convertirlo en acetato se produce por la reducción del NAD<sup>+</sup> a su forma NADH.



**Figura 2. Reacciones de metabolismo del alcohol etílico [133].**

En cuanto a la vía no oxidativa, el alcohol etílico se conjuga con distintos metabolitos endógenos y forma compuestos como la fosfolipasa D, fosfatidilalcohol etílico o los esteres etílicos de ácidos grasos [134]. Otras formas de metabolismo del alcohol etílico también son el metabolismo oxidativo por el citocromo P4502E1 y la oxidación del

alcohol etílico en el cerebro por parte de la catalasa, usando peróxido de hidrógeno como sustrato [135].

ii. Efectos del consumo de alcohol etílico sobre la salud

Como consecuencia del metabolismo del alcohol etílico, se alteran diversos procesos biológicos de señalización y del metabolismo, llegando a afectar a funciones muy importantes de diversos órganos y sistemas.

Uno de los efectos que se produce por el metabolismo del alcohol etílico es una acumulación de NADH, con lo que aumenta la ratio NADH/NAD<sup>+</sup>. El aumento de esta ratio produce la inhibición de la gluconeogénesis en el hígado porque impide la oxidación del lactato a piruvato. Esto interrumpe la generación de glucosa a partir del piruvato, produciéndose hipoglucemia. Además, se acumula lactato en el organismo, que es un compuesto tóxico que produce acidosis láctica; se alteran las cadenas oxidativas de las mitocondrias y se genera estrés oxidativo [112]. Por último, esta modificación de la ratio NADH/NAD<sup>+</sup> bloquea el ciclo de Krebs, debido a la inhibición de la enzima isocitrato deshidrogenasa y la oxoglutarato deshidrogenasa. Esto tiene como consecuencia la formación de cuerpos cetónicos, lo que agrava la acidosis producida por el lactato, ya que no se puede eliminar la acetil-Coenzima A (Acetil-CoA) producida durante el metabolismo del alcohol etílico, en el paso de transformar el acetaldehído en acetato.

Por otra parte, con el tiempo el metabolismo del alcohol etílico también se ve afectado y se produce acumulación de acetaldehído, aumentando la toxicidad en el organismo y el fallo en la acción de muchas proteínas con las que reacciona el acetaldehído, afectando a la regulación de la señalización de la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK), afectando a varios sistemas de señalización (como la PI3K) y produciendo daños y mutaciones en el ADN, ya que impide el normal funcionamiento del sistema de reparación del ADN [134], [136]. Por este último motivo, la Agencia

Internacional de Investigación en Cáncer (IARC en inglés) ha relacionado el consumo de bebidas alcohólicas con una mayor probabilidad de sufrir distintos tipos de cáncer, como el cáncer de la cavidad oral, orofaringe, hipofaringe, laringe, esófago, colon, rectal, hígado, ducto biliar y cáncer de mama [137].

El acetaldehído, además, promueve la lipólisis en el tejido adiposo en un proceso que implica a las proteínas transportadoras de ácidos grasos libres, a la vez que el exceso de NADH también produce la inhibición de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias y se activa la síntesis de ácidos grasos, produciendo una acumulación de triglicéridos en el hígado y el torrente sanguíneo [134]. A su vez, la acumulación de lípidos en el hígado produce la muerte de los hepatocitos y un proceso de reparación en el que se forma tejido cicatrizante fibrótico que disminuye la función metabólica del hígado, causando fallos hepáticos y enfermedades como la esteatosis hepática, la hepatitis alcohólica, la cirrosis, fibrosis hepática [138], [139] y la pancreatitis, cuya probabilidad de aparición también está asociada a un consumo excesivo de alcohol etílico (más de 40g/día) [140].

Además de los daños citados, el abuso de bebidas alcohólicas puede afectar al sistema endocrino, afectando a la secreción de hormonas que controlan los flujos de información entre los distintos órganos y células, así como a la homeostasis de ciertas sustancias en el cuerpo, como los electrolitos, lo que puede resultar en alteraciones en diversos sistemas hormonales como el eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal (HPA), el eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG), el eje hipotalámico-pituitario-tiroides (HPT), el eje hipotalámico-pituitario-hormona de crecimiento/factor de crecimiento similar a la insulina-1 (GH/ IGF-1) y el eje hipotálamo-hipófisis posterior (HPP) [135], [141].

Por otro lado, el consumo moderado de bebidas alcohólicas tiene ciertos efectos beneficiosos. El consumo moderado de alcohol etílico, combinado con una dieta sana y

actividad física regular, puede mejorar el riesgo de sufrir CVD cerca de un 80% y las muertes por enfermedades coronarias en alrededor de un 25% [142], [143], ya que aumenta el HDL y potencia su función en el organismo [131].

En cuanto a cómo afecta el consumo de bebidas alcohólicas al cerebro, el consumo de alcohol etílico produce daños en el cerebro, ya sea un consumo moderado o elevado. La diferencia radica en si el cuerpo tiene capacidad para reparar los daños causados. El consumo de alcohol etílico genera un aumento del estrés oxidativo del cerebro, generando neurotoxicidad por acción del alcohol etílico y sus metabolitos, incrementando la pérdida neuronal, gliosis, peroxidación lipídica, neurodegeneración y daños a los neurotransmisores [128].

A altas concentraciones, el alcohol etílico puede modificar las membranas celulares y causar cambios no específicos en la actividad neuronal. Además, también afecta a los canales de recompensa del cerebro, inhibiendo los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), que son mediadores de los efectos del alcohol etílico [144], [145]. Aunque esta inhibición se ve mitigada en parte por el efecto que tiene el alcohol etílico sobre la DARPP-32 (fosfoproteína regulada por cAMP y Dopamina) y sobre la proteína tirosina quinasa Fyn, que se fosforila en la subunidad NR2B por efecto del alcohol etílico y aumentan la actividad de la NMDA.

El consumo excesivo de alcohol etílico, además, afecta al circuito de Papez y al circuito fronto-cerebeloso, responsable de las funciones ejecutivas del cerebro, alterando su funcionamiento y provocando desinhibición, fallos en el razonamiento, la actividad motora, el cálculo, y amnesia temporal, cuando se consume de manera puntual una gran cantidad de alcohol etílico [146], [147], [148], [149], [150], motivo por el que el alcohol etílico es una de las causas principales de los accidentes de tráfico. Además, el consumo de alcohol etílico también acciona el sistema gabaérgico y produce somnolencia, aunque

no produce un estado de sueño profundo ya que afecta a la fase REM, y por tanto a la memoria a largo plazo [150]. Si el abuso del alcohol etílico es continuado, también se produce adicción por “adaptación neural”, proceso por el cual el alcohol etílico pierde su efecto en el cerebro y se requieren dosis mayores para alcanzar los mismos estados de embriaguez y sus efectos. Además, el consumo excesivo de bebidas alcohólicas también se ha asociado con trastornos de ansiedad, depresión, demencia y comportamientos antisociales [131], [151], [152], que se relacionan en parte con la liberación de citoquinas y productos proinflamatorios debido a la acción del alcohol etílico sobre el receptor inmune TLR-4 [149], [153].

Anteriormente se ha citado que el consumo de alcohol etílico afecta al eje HPA, que es responsable entre otros de la respuesta al estrés y está relacionado con el sistema inmune. El consumo de alcohol etílico produce desajustes en la migración de los neutrófilos al lugar de infección y está relacionado con la modulación de la respuesta de los linfocitos, afectando a su maduración y activación, y a la liberación de citoquinas, como las interleuquinas 4, 10 y 13 o la TNF- $\alpha$  [154], [155]. Además, el consumo crónico de alcohol etílico también afecta a la respuesta de las células T, disminuyendo la cantidad de células antígeno-específicas CD8<sup>+</sup> T, causando inmunodeficiencia [156], [157]. Teniendo estos datos en cuenta, y uniéndolos al hecho de que el consumo de bebidas alcohólicas es un acto social en muchas ocasiones, es fácil entender por qué el alcohol etílico tiene un efecto directo sobre la transmisión de algunas enfermedades como el Covid-19, la tuberculosis o la neumonía [158]. Además, debido a la desinhibición que produce, el efecto de relajación y la pérdida de sensación de peligro, facilita la transmisión de enfermedades de transmisión sexual, como el VIH, por el aumento de la práctica del sexo sin protección [129], [158].

El abuso de bebidas alcohólicas durante el embarazo también produce daños irreparables al feto, causando malformaciones, aborto espontáneo, nacimiento prematuro, déficits cognitivos y menor desarrollo cerebral, además de daños en órganos importantes como el corazón, el hígado y los pulmones [129], [159].

En su último informe, la organización mundial de la salud también incluye a la diabetes como una de las enfermedades relacionadas con el consumo de alcohol étílico. Esta relación se tratará en el siguiente punto debido a su interés para la tesis que aquí se escribe.

## c. ESTRÉS OXIDATIVO COMO MECANISMO

### FISIOPATOLÓGICO

#### i. Estrés oxidativo. Radicales libres

El proceso de evolución ha permitido que las células de los organismos aeróbicos se aprovechasen del oxígeno existente en el planeta para sobrevivir, tanto como organismo, facilitando el proceso de respiración; como a nivel celular, donde nuestras células han desarrollado un complejo sistema para sobrevivir en entornos con alto contenido en oxígeno [160].

Así, en nuestras células se producen transferencias de electrones entre especies químicas que contienen oxígeno mediante procesos que implican reducciones y oxidaciones químicas. Estos procesos, pueden ser muy beneficiosos para nuestro cuerpo, como cuando las células usan estas reacciones durante la respiración celular para eliminar especies altamente reactivas e inestables, conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS); o cuando las células usan este mecanismo para eliminar los organismos infecciosos que las atacan. Cuando hay un equilibrio entre la producción de las ROS y la capacidad de contrarrestarlos por parte del cuerpo mediante sustancias llamadas antioxidantes, tenemos homeostasis redox, mientras que, si la producción de ROS es excesiva y no puede ser contrarrestada, hay estrés oxidativo [161].

Las ROS son especies procedentes principalmente de la respiración aerobia que contienen oxígeno. Las ROS pueden ser radicales como los aniones superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxilo ( $OH^\cdot$ ); o compuestos químicos, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) [160].

Los radicales libres (RL) son moléculas que presentan un electrón desapareado en su orbital molecular más externo, por lo que son especies altamente inestables y reactivas, ya que buscan completar la configuración electrónica para tener una configuración

química estable [162]. Por esta razón, reaccionan con las moléculas cercanas, desestabilizando su configuración electrónica y llegando a desencadenar reacciones en cadena.

Del mismo modo que hay especies reactivas de oxígeno derivadas del metabolismo del oxígeno, existen las especies reactivas del nitrógeno (RNS), derivadas del metabolismo del óxido nítrico. El óxido nítrico es un compuesto altamente reactivo, debido a la vacante de un electrón en su configuración electrónica, y reacciona con el oxígeno molecular, ROS, tioles y oligoelementos como los metales de transición; formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y óxidos de nitrógeno como el trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) y el dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ) [163]. Estos compuestos suelen incluirse de manera genérica dentro de los RL, aunque al igual que las ROS, no todos los compuestos derivados del metabolismo del nitrógeno sean radicales libres.

De forma habitual, es común utilizar de manera indistinta los términos ROS, oxidantes y RL, aunque como hemos visto existen pequeñas diferencias entre ellos [161].

#### *a. Papel fisiológico.*

Los radicales libres tienen una función muy importante a nivel celular como defensa ante agresiones externas producidas por microbios y virus, así como reguladores de la función celular actuando como mensajeros [164]. También tienen un papel clave en la activación de enzimas, así como en la activación de los procesos inflamatorios. En el caso de las RNS también son muy importantes en la regulación de funciones del sistema cardiovascular y nervioso.



## ii. Papel patogénico.

La aparición de radicales libres y ROS en el organismo ha sido relacionada con enfermedades como la hipertensión [165], las CVD [166], la inflamación sistémica [167], la diabetes [70], el SIDA [168], la epilepsia [169], el MetS [59], [170], etc.

Estos radicales tienen la capacidad de alterar los mecanismos celulares y fisiológicos, produciendo déficits o daños en diversos sistemas, ya que provocan mutaciones en el ADN y daño en las proteínas y los lípidos que forman parte de la membrana celular [124].

### *i. Generación de radicales libres.*

Los RL, ROS y RNS pueden proceder tanto del propio metabolismo (fuentes endógenas) como de agresiones externas (fuentes exógenas). Entre las fuentes más comunes podemos citar la cadena electrónica mitocondrial, la actividad de la NADPH fagocitaria, el metabolismo del ácido araquidónico, la deslocalización de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$  de sus sitios de depósito y su oxidación (reacciones de Fenton y Haber-Weiss), la hiperactividad de la xantina oxidasa, la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa, disminución de la actividad de moléculas antioxidantes, radiaciones ionizantes, metabolismo y acción de fármacos y xenobióticos, procesos inflamatorios y exceso en la concentración de oxígeno (como el caso de terapias con oxígeno) [160].

## iii. Peroxidación lipídica

### *a. Concepto.*

Llamamos peroxidación lipídica al deterioro de las membranas de fosfolípidos de las células por acción del radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ). Cuando este radical se genera cerca de las membranas celulares, ataca a los ácidos grasos poliinsaturados que forman los fosfolípidos, como el ácido docosahexaenoico o el ácido araquidónico, y forma

hidroperóxidos, unos compuestos muy inestables y que generan nuevos radicales libres, que a su vez, pueden iniciar nuevas cadenas de peroxidación (Figura 3)[171].

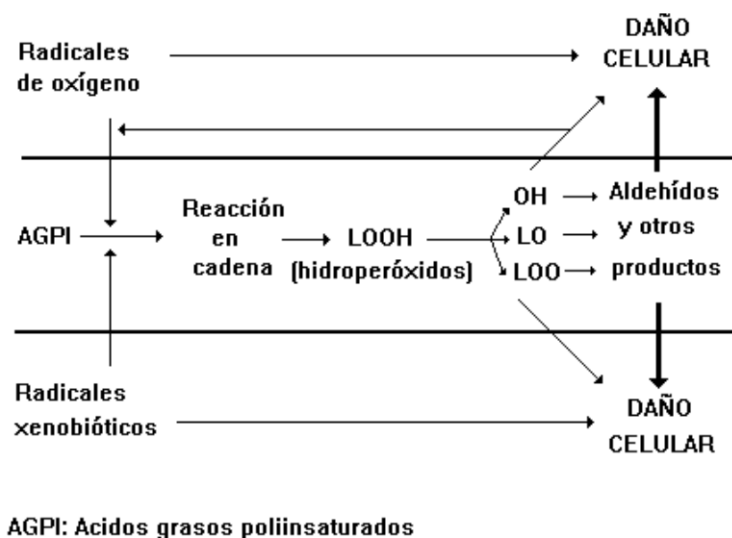


Figura 3. Esquema de mecanismos implicados en la lipoperoxidación [172].

### *i. Productos de la peroxidación de lípidos.*

Entre los diferentes subproductos que se forman por la peroxidación lipídica, están el grupo de los aldehídos, que por su capacidad reactiva han sido altamente estudiados. Entre los más estudiados podemos encontrar el malondialdehído o MDA, el 4-hidroxinonanal y el 4-hidroxihexenal.

#### *i. Malondialdehído (MDA)*

El propanodial, más conocido como malondialdehído es una molécula formada por un grupo 1,3-dicarbonilo, con fórmula  $C_3H_4O_2$  y un peso molecular de 72,06 g/mol. Debido a que es una molécula muy pequeña, es volátil y, en fase gaseosa y en disolución, está en equilibrio con la forma enólica, por lo que es moderadamente ácida con un  $pK_a = 4,46$  [173].

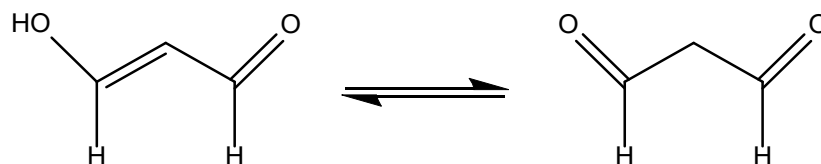


Figura 4. Equilibrio ceto-enólico del MDA.

El MDA, se forma a partir de la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido araquidónico (ácido 5,8,10,12-eicosatetraenoico). En el proceso de formación del MDA, se produce la ciclación del ácido originario como primer paso para romperse posteriormente, dando como subproducto el MDA (Figura 5). Dado que la formación del malondialdehído es independiente del ácido graso poliinsaturado de partida, se ha aceptado el uso del MDA como marcador del proceso de peroxidación lipídica de manera general, siendo la determinación por HPLC la técnica más adecuada, ya que la determinación por espectroscopía es poco selectiva y determina productos no provenientes de peroxidación lipídica [172], [174].

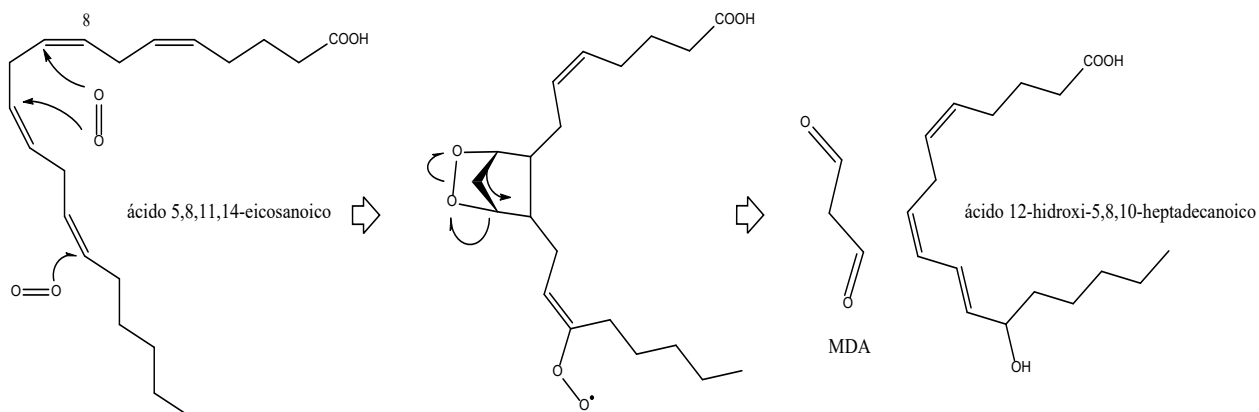


Figura 5. Degradación oxidativa del ácido araquidónico y formación del MDA [173].

#### iv. Defensa antioxidante

##### i. *Sistemas antioxidantes de importancia biológica.*

Los antioxidantes son sustancias que retrasan o previenen la oxidación de un sustrato oxidable (DNA, lípidos, carbohidratos o proteínas), aun cuando esté a baja concentración respecto al sustrato [162].

Como se ha comentado anteriormente, la homeostasis redox es el equilibrio entre las especies oxidantes y antioxidantes, por lo que las células han desarrollado un potente sistema antioxidante para mantener este equilibrio y evitar que las especies oxidantes dañen a la propia célula. Esta defensa antioxidante está formada por recolectores y neutralizadores no enzimáticos llamados antioxidantes, como las vitaminas C y E o el glutatión; y por enzimas con actividad antioxidante. Estas últimas se dividen en enzimas antioxidantes primarias, que actúan directamente sobre las ROS, como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y reductasa; y en enzimas antioxidantes secundarias, que complementan los sistemas antioxidantes, manteniéndolos o conjugando sustancias derivadas de la acción de las ROS, como la glutatión S-transferasa.

#### *ii. El sistema glutatión.*

El glutatión es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina y, junto con las enzimas relacionadas con su metabolismo, forma el sistema glutatión (Figura 6). El glutatión es un compuesto muy reactivo debido a la presencia de un grupo tiol (-SH) libre en su estructura. Además, cuenta con un enlace  $\gamma$ -glutamilo que lo protege de las peptidasas [175]. El glutatión puede encontrarse en distintas formas y estados de oxidación, por eso se puede encontrar con el tiol en su forma reducida (GSH), con el tiol en su forma oxidada (GSSG) y en forma de disulfuros mixtos, mayoritariamente formando uniones con proteínas (GS-S-proteína). Las concentraciones de estas formas redox del glutatión no son constantes en el tiempo y dependen de las alteraciones a las que se vea sometido el sistema.

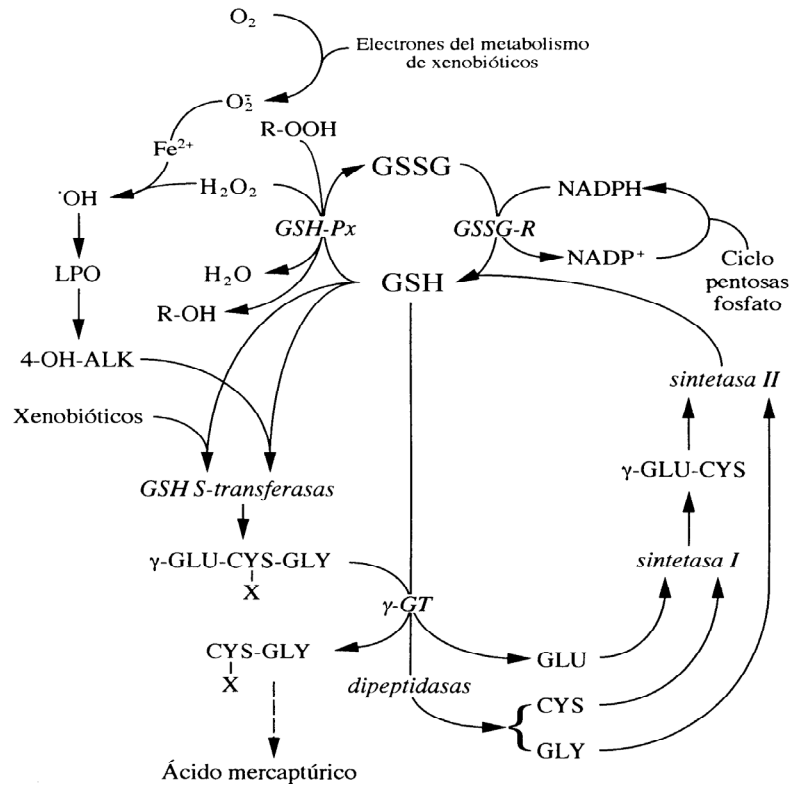


Figura 6. Representación del sistema glutatión (Modificada de Muriach [176]).

Las enzimas más importantes que intervienen en el sistema glutatión son:

- Glutatión peroxidasa (GPx). Esta enzima contiene selenio y recibe su nombre de la capacidad que tiene para reducir el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a agua. La función principal de esta enzima es proteger las membranas celulares de la peroxidación lipídica. Es la principal enzima de la actividad peroxidasa en las células.
- Glutatión disulfuro reductasa (GR). Esta enzima es la encargada de reducir el glutatión disulfuro (GSSG) que se forma en las reacciones de peroxidación a su forma reducida (GSH). Esta enzima actúa como catalizador de la reducción del GSSG en presencia de NADPH.
- Gamma Glutamyl transpeptidasa ( $\gamma$ -GT). Esta enzima cataliza la transferencia del grupo gamma glutamilo en el proceso de regeneración de los aminoácidos para

formar nuevo GSH. Su función está relacionada con el paso de aminoácidos a través de la membrana celular.

#### d. ESTRÉS OXIDATIVO, METS, DIABETES Y CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO

Tal y como se ha puesto de manifiesto hasta ahora, el consumo de bebidas alcohólicas tiene un efecto adverso sobre diversos órganos y sistemas, como el sistema nervioso central o el endocrino; e incluso puede contribuir a un aumento de la mortalidad. Por supuesto, muchos de los efectos descritos son dependientes de la dosis de alcohol etílico consumida y del modelo de ingesta, siendo peores los consumos abusivos en cortos períodos de tiempo que el mismo consumo moderado a lo largo del tiempo [177]; y del tipo de bebida alcohólica consumida [178], [179], [180], [181], [182], [183].

En el caso de los efectos del alcohol etílico sobre el metabolismo de la glucosa y el desarrollo de la diabetes, no hay un consenso científico respecto a si el consumo de bebidas alcohólicas favorece o reduce la probabilidad de sufrir esta enfermedad y sus efectos. Diversos estudios señalan que el alcohol etílico podría producir un efecto dependiente de la dosis: favoreciendo el desarrollo de la T2D y CVD en consumos muy limitados y abusivos, y previniéndola en consumos moderados. Estos estudios apuntan que la curva que representa la relación entre el consumo de alcohol etílico y la aparición de la diabetes o la sensibilidad a la insulina tiene forma de U (también conocida como forma J) [182], [184], [185], [186], [187], [188], [189], [190], [191]. Sin embargo, algunos autores señalan que podría haber una sobreestimación de los beneficios del alcohol etílico y que éstos tan sólo serían significativos en mujeres y personas no asiáticas [187], [189].

La reducción del riesgo de padecer T2D podría estar asociada a los efectos que el alcohol etílico causa sobre el metabolismo de la glucosa. En primer lugar, el alcohol etílico reduce la glucogenólisis a partir del glicerol, debido a que su metabolismo por la acción de la

enzima alcohol deshidrogenasa modifica la ratio NADH/NAD<sup>+</sup>, reduciendo la cantidad de piruvato y, por tanto, reduciendo la piruvato-carboxilasa, que es la enzima limitante del proceso y reduciendo la cantidad de glucosa producida por el hígado [192]. Además, el contenido de glicerol en el hígado y los niveles de FFA en plasma también se ven disminuidos [186], [193], por lo que contribuyen más si cabe a la inhibición de la glucogenólisis. Por su parte, Fromenty y sus colaboradores encontraron mejoras en la T2D en ratones *ob/ob* por acción del alcohol etílico, reducción de la glucemia y de los triglicéridos, aunque los ratones mostraban niveles de FFA mayores [194].

Por su parte, otros autores señalan que el consumo moderado de alcohol etílico aumenta la tolerancia a la glucosa, bien sea por un aumento en la secreción de insulina o por un aumento en la sensibilidad a la insulina [186], aunque los mecanismos que producen estos efectos no están claros y algunos de estos efectos podrían venir dados por la condición previa de la persona que toma la dosis de alcohol etílico. Así, por ejemplo, se ha observado que la hipoglucemia causada por el alcohol etílico depende del estado de nutrición o ayuno de la persona [186], [195], así como si presentaba diabetes [196], [197]. Para aumentar la controversia, otros estudios muestran que tanto la infusión de alcohol etílico durante pocas horas o, incluso, el consumo moderado durante algunos años no afectan a la tolerancia a la glucosa [198], mientras que otros estudios con humanos y con animales de laboratorio tienen como resultado una menor tolerancia a la glucosa [199].

La literatura parece indicar que el consumo agudo y crónico de alcohol etílico afecta la secreción de insulina y el consumo de glucosa estimulado por la insulina en las células del músculo esquelético [186], aunque incluso aquí, hay resultados contradictorios entre sí. De un lado, se ha observado que no hay variación de los niveles de glucosa debidos al consumo de alcohol etílico, y esto puede explicarse por una disminución de la fosforilación del IR-1 y del Akt [200]. Aunque, por otro lado, se sabe que el consumo de



alcohol etílico produce un aumento del calcio intracelular y un aumento de la secreción de la insulina [201]. Además, el alcohol etílico inhibe la secreción de insulina *in vitro*, aunque cuando se estudió este efecto en modelos *in vivo* los resultados fueron que el alcohol etílico aumenta la secreción de insulina estimulada por la glucosa (GSIS) [186]. El consumo de alcohol etílico puede afectar a diversos procesos que regulan la secreción y efecto de la insulina, como la señalización PI3K/Akt y la traslocación del GLUT4, así como a la regulación y expresión de la glucoquinasa (GCK) [112].

El consumo de bebidas alcohólicas está relacionado con una reducción de la masa de células beta y su disfunción [178]. Esta reducción de la masa de células  $\beta$  y su función está causada por el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) provenientes del metabolismo del alcohol etílico en el organismo, que altera la cadena oxidativa mitocondrial provocando la disfunción de las mitocondrias y causando la apoptosis de las células  $\beta$  [141], [178], [202].

Además, no queda claro del todo si el efecto beneficioso del consumo de bebidas alcohólicas se produce por el hecho de consumir alcohol etílico *per se* o sí, por el contrario, es un efecto producido por el resto de componentes de la bebida alcohólica. Así, por ejemplo, se han asociado los efectos beneficiosos del consumo de vino tinto al ácido tánico [179], los polifenoles y, en especial, al resveratrol, por sus efectos antiinflamatorios, antioxidantes, vasculares y de sensibilización a la insulina [181]. Por otro lado, mientras que algunos autores no encuentran diferencias en los efectos producidos en la glucosa entre distintos tipos de bebidas alcohólicas [179], otros muestran que estos efectos dependen del tipo de bebida alcohólica. Así, por ejemplo, el consumo moderado de cerveza mejora la sensibilidad a la insulina e influye positivamente en los factores de riesgo cardiovasculares y del MetS de manera similar la producida por el vino

[183], aunque otros autores señalan que el vino es la bebida alcohólica el que presenta una mayor protección frente a la T2D [182].

Según la literatura, existe una relación entre el consumo de alcohol etílico y el desarrollo de MetS. La evidencia epidemiológica sugiere que hay una compleja relación entre el consumo de alcohol etílico y el desarrollo de MetS debido en parte a que es común que los pacientes con MetS sean consumidores de alcohol etílico [203]. Diversos estudios han asociado el consumo de alcohol con el desarrollo de MetS. De esta manera, el consumo de alcohol etílico en dosis elevadas ha sido asociado con el desarrollo de MetS y el empeoramiento de las consecuencias de este síndrome (aumento de presión arterial, obesidad abdominal, hipertrigliceridemia y diabetes), mientras que el consumo moderado de alcohol etílico ha sido atribuido a una menor prevalencia de MetS [204], [205], [206]. Cabe destacar, que el consumo de alcohol etílico de manera moderada puede mejorar las consecuencias del MetS. Así, el consumo de alcohol etílico aumenta el colesterol HDL y reduce el LDL [181], [207], reduce el peso corporal y aumenta la secreción de adipocitocina, una hormona secretada por los adipocitos que estimula la oxidación de ácidos grasos y reduce los triglicéridos plasmáticos [112], [141], aumentando la sensibilidad a la insulina [208] y mejorando, en general, los riesgos cardiovasculares [183]. Algunos autores han apuntado que parte de los beneficios cardiovasculares producidos por el consumo de alcohol etílico se deben al efecto vasodilatador del alcohol etílico [209]. Por otra parte, otros estudios apuntan que suministrar alcohol etílico a personas con obesidad o riesgos cardiovasculares podría complicar estas enfermedades [112], [202], encontrándose un efecto similar en personas mayores [193].

Tal y como se ve, a pesar de que algunos autores hayan encontrado relación entre el consumo de bebidas alcohólicas y la reducción de la diabetes, llegando en algunos

estudios a suponer reducciones del riesgo de sufrir T2D que varían entre un 30 y un 56% [190], [191], [210], existe una gran controversia científica respecto a los efectos del alcohol etílico en la T2D y en el MetS, ya que aún no están claros los mecanismos por los que se producen esos efectos o, ni siquiera si son producidos por el consumo de alcohol etílico.

El estrés oxidativo está relacionado con el desarrollo de numerosas patologías neurodegenerativas y metabólicas, como el cáncer, la diabetes o el alzhéimer [93], [167]. Como se ha comentado anteriormente, esto es así por la capacidad de las ROS para alterar la función y estructura de proteínas, genes, enzimas y alterar señales celulares. En el caso de la diabetes, por ejemplo, se cree que las ROS afectan directamente a la secreción de insulina estimulada por la glucosa mediante la interrupción de las señales provenientes del metabolismo de la glucosa [111] y a la muerte de las células  $\beta$ , secretoras de la insulina [84].

Otro de los efectos que tiene el estrés oxidativo en la diabetes es la inactivación de diversas enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), encargada de eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno; o la reducción de la actividad de la vitamina C y el GSH, por lo que aumenta el daño producido y aumenta la inflamación de los tejidos, aumentando los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  [71], [93], [160]. De hecho, la inflamación crónica de los tejidos es una de las características del MetS, ya que la sobrealimentación activa las señales proinflamatorias y, causa y propaga daños en las células, aumentando el estrés oxidativo y alimentando el círculo vicioso. El estrés oxidativo activa la ruta NF- $\kappa\beta$ , que tiene como resultado la formación de compuestos citotóxicos, el aumento de la inflamación sistémica, la disminución de la acción de la insulina y la apoptosis celular. Este efecto es particularmente dañino a nivel de las células beta, ya que tienen baja actividad de enzimas antioxidantes, como la SOD, catalasa y GPx [70], [211], lo que las

hace más susceptibles del daño celular, causando muerte de las células  $\beta$  y el desarrollo de la diabetes [84]. También es muy importante el daño oxidativo producido al sistema nervioso central, ya que se ha relacionado la disminución de la defensa antioxidante y el aumento de la peroxidación lipídica causada por ROS con muerte celular en casos de diabetes y de exposición al alcohol etílico [212].

Uno de los órganos más susceptibles al estrés oxidativo es el cerebro, ya que consume una gran cantidad de energía y oxígeno para mantener su función y es uno de los órganos encargados de controlar las funciones metabólicas del cuerpo. De hecho, el cerebro es el encargado de regular el consumo de energía, a través de las señales que recibe y emite desde el hipotálamo. En este caso, el estrés oxidativo causa muerte de las neuronas y daña la comunicación entre ellas, causando enfermedades como el Alzheimer [167].

Por su parte, la hipertrigliceridemia, la hipertensión, hiperglucemia, la resistencia a la insulina y la obesidad están relacionadas con un aumento de la producción ROS, en especial de aniones superóxido en las mitocondrias, debido a un exceso de aporte de electrones a la cadena respiratoria y falta de actividad física [59], [170]. Se establece así una relación entre el MetS y el estrés oxidativo. En este sentido, James y cols. proponían que el desequilibrio causado por excesivo estrés oxidativo en las señales redox que controlan el almacenamiento y consumo de energía podrían ser la causa del MetS [59]. A parte de esta hipótesis, la alteración de los niveles de HDL en el MetS disminuyen la actividad antioxidante de esta lipoproteína, aumentando el estrés oxidativo en el MetS. A su vez, el estrés oxidativo afecta a los niveles de óxido nítrico en sangre, por lo que aumenta la disfunción endotelial, aumentando el riesgo de sufrir infartos y accidentes cerebrovasculares. Además, la alteración del metabolismo de los lípidos por parte de la glucosa favorece la esterificación de los lípidos y la formación de ceramida, que está relacionada con el aumento del estrés oxidativo [70].

A parte de las causas de estrés oxidativo relacionadas con el metabolismo y la enfermedad, los hábitos de vida poco saludables también contribuyen al estrés oxidativo. Así, por ejemplo, la actividad física se ha relacionado con una modificación en los niveles de estrés oxidativo [71], [213], mientras que el consumo de dietas elevadas en contenido graso aumenta el daño oxidativo celular [125].

Por otra parte, el consumo de alcohol etílico está relacionado con un aumento de la producción de ROS, ya que durante su metabolismo se producen sustancias altamente reactivas, como el acetaldehído y radicales libres como el hidroxilo, que forma  $H_2O_2$ ; lo que podría explicar la neuroinflamación y el daño causado al cerebro debido a su consumo [128].

Además, por si todo esto fuera poco, también se ha demostrado la existencia de una relación directa entre el MetS y la contaminación ambiental, que podría deberse al estrés oxidativo causado por la exposición a las toxinas ambientales [44].

## e. MODELOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los modelos de experimentación animal son herramientas que actualmente siguen siendo imprescindibles para avanzar en el estudio de distintas enfermedades, patologías y conductas humanas, así como para asegurar la seguridad de medicamentos y productos de uso cotidiano.

Entre las ventajas que podemos encontrar en la experimentación animal, podemos citar la ventaja de eliminar algunas variables de los individuos de estudio, como son los diferentes estilos de vida, alimentación, heterogeneidad genética y la imposibilidad o dificultad de obtener muestras de tejidos y órganos en humanos. La posibilidad de manipular genéticamente a los animales de experimentación para expresar o bloquear ciertas características para avanzar en la investigación de factores genéticamente determinados, como la síntesis de proteínas y sus efectos en el metabolismo, o incluso predisposiciones y enfermedades genéticas, es otra de las grandes ventajas de los modelos animales de experimentación.

Por el lado de los inconvenientes, hay que tener en cuenta que sigue existiendo gran diferencia entre el metabolismo animal y el humano, por lo que resulta difícil extrapolar todos los resultados obtenidos en la investigación animal a los humanos. Además, cabe resaltar las dificultades inherentes al uso de animales de investigación, tales como los requisitos administrativos, operativos (instalaciones) y de formación, así como las consideraciones éticas asociadas.

A pesar de estas consideraciones, la experimentación animal sigue siendo una herramienta válida y útil para la obtención de datos valiosos que han permitido avanzar en la investigación en campos de la medicina y la psicología, entre otras.

### i. Modelos animales de MetS y diabetes

Debido a los problemas socioeconómicos y para la salud que causan tanto la diabetes como la obesidad y el MetS, se han llevado a cabo numerosas investigaciones científicas usando modelos animales para avanzar en el conocimiento y tratamiento de estas enfermedades. Por este motivo, en la bibliografía podemos encontrar distintos modelos de experimentación animal.

La gran mayoría de estos modelos son modelos animales de especies roedoras, principalmente ratones y ratas, aunque también se han desarrollado métodos con primates y otros mamíferos como los cerdos [214], [215]. El motivo de este uso intensivo de especies roedoras es debido a la facilidad de manipulación, el ciclo de vida de estos animales y el coste económico más bajo, en comparación con otras especies mamíferas, que requieren instalaciones mayores, más costosas y más tiempo para obtener resultados.

En cuanto a los modelos roedores, podemos diferenciar dos grandes grupos: los modelos espontáneos o genéticos y los modelos inducidos. Los modelos espontáneos o genéticos son estirpes que, mediante cruces endogámicos o modificaciones genéticas, presentan las características de la enfermedad que se quiere investigar. En el caso de la diabetes, en este grupo podemos encontrar los ratones *ob/ob*, *db/db*, Rata obesa y diabética Zucker (ZDF), Rata obesa Otsuka Long Evans Tokushima (OLETF), Rata Goto Kakizaki (GK) o Tori diabética espontánea (SDT) [214], [216]. Por otro lado, los modelos inducidos son cualquier estirpe de roedor que, no presentando las características de la enfermedad a estudiar de manera natural, presentan estas características tras ser inducidas por fármacos. En este grupo podríamos encontrar, por ejemplo, los ratones C57BL6 a los que se les administra aloxana o estreptozocina para generar los efectos de la diabetes tipo 1 [217].

Los modelos experimentales más usados en MetS y diabetes son los ratones *ob/ob*, *db/db* y *Ay/a*, además de las ratas *fa/fa* y los modelos inducidos principalmente por dieta [218], [219].

- Ratones *ob/ob*

Los ratones *ob/ob* son ratones C57BL6 con una mutación en el gen *ob*, lo que previene la síntesis de leptina funcional [220]. Este gen fue descubierto por clonación posicional, abarca 650 kilobases, consta de 3 exones separados por 2 intrones y codifica 4.5 kilobases de mRNA [63].

La hormona leptina es producida y secretada por los adipocitos blancos y actúa en los receptores del hipotálamo para controlar el consumo de energía en el cuerpo a través del control del apetito, el ratio metabólico, el metabolismo y almacenamiento lipídico y las concentraciones en sangre de glucosa e insulina [58], [63]. Además de estos aspectos, la leptina también modula el sistema inmune, el metabolismo de los huesos y la angiogénesis [221] y juega un papel importante en la maduración del aparato reproductivo y el desarrollo cerebral en ratones [63].

Debido a la falta de leptina funcional y los procesos fisiológicos en que esta proteína actúa, los ratones con esta mutación presentan hiperfagia y muestran un fenotipo obeso (de ahí su nombre *ob*) [222], que es fácilmente apreciable a las pocas semanas de edad, llegando a pesar más de 100g a los 12 meses de edad [218], [223]. Además, presentan un gran número de anormalidades endocrinas y metabólicas como son la dislipidemia, esteatosis hepática, son estériles, muestran defectos neuronales y tamaños cerebrales reducidos, hipotermia y arterosclerosis [58], [63], [218], [221], [223].

Debido a la falta de acción de la leptina como regulador del metabolismo de la glucosa, estos ratones presentan niveles ligeramente elevados de glucosa en sangre que compensan



mediante un aumento de la masa de las células beta y de secreción de insulina, por lo que presentan hiperinsulinemia [63], [214], [216], [218], [223]. Ésta, en combinación con la obesidad, lleva al desarrollo de la T2D por lo que han sido ampliamente utilizados como modelos animales de MetS [216], [218], aunque no presentan hipertensión [224]. Cabe señalar, que en los casos que aparece la T2D, esta suele desaparecer a partir de los 6 meses de edad, cuando los valores de glucemia se estabilizan en un valor casi normal [223].

- Ratones *db/db*

Los ratones *db/db* son ratones que, de manera similar a los ratones *ob/ob*, sufren una mutación genética que afecta al efecto de la leptina en el metabolismo, si bien mientras que la mutación causada en el locus *ob* genera una leptina no funcional, en el caso de la mutación locus *db* se produce una modificación de los receptores de leptina, por lo que no son capaces de responder a la presencia de la molécula [63].

Como en el caso de los ratones *ob/ob*, los ratones *db/db* presentan obesidad temprana, hiperfagia, perfiles lipídicos similares a los ratones *ob/ob*, esteatosis hepática y deficiencia neuronal [58], [63], [218], [221], [223], aunque todos estos síntomas son más acentuados y presenta menor esperanza de vida que los ratones *ob/ob* [216]. Al contrario que los ratones *ob/ob*, los ratones *db/db* no normalizan los niveles de glucemia con el tiempo (de ahí el nombre *db*, en referencia a diabetes) y muestran alteraciones estructurales en los órganos asociadas a la diabetes [72]. Además, presentan picos de leptina circulante en el torrente sanguíneo [218].

- Ratones *Ay/a*

Los ratones Agouti o lethal yellow (de ahí el nombre Agouti yellow, *Ay*) son ratones con una mutación en el locus del cromosoma 2 que codifica el péptido agouti [225]. Este

péptido es un antagonista de la melacortina en el cerebro y bloquea el efecto de la leptina en el cerebro [218], [224], [225].

Debido a esta mutación, estos ratones tienen un característico pelaje de color amarillo y desarrollan obesidad. Además, también presentan hiperinsulinemia, dislipidemia, hiperleptinemia, presión arterial elevada y, en el caso de los machos, hiperglicemia [224]. Por su parte, a diferencia de los ratones *ob/ob* y *db/db* no presentan infertilidad, aunque sí son propensos a la formación de tumores [218].

#### - Modelos inducidos por dietas

Existen diversos modelos animales de MetS inducidos por dieta, encontrándose entre los modelos más utilizados las ratas Sprague-Dawley, ratas Wistar, los ratones C57BL/6J y los Hámster dorados sirios [219]. A pesar de que existan diversos modelos animales, que más o menos pueden favorecer la aparición del MetS, para esta forma de inducir el MetS es más relevante el tipo de dieta usado y las características del MetS generado.

El modelo animal inducido por dietas con alto contenido graso ha mostrado ser un buen modelo para estudiar los efectos de la obesidad, debido a que permite rellenar lagunas como el efecto regulador del metabolismo de la leptina, que no puede ser tenido en cuenta en modelos como los ratones *ob/ob*. A pesar de la diferencia en la leptina, el metabolismo de los ácidos grasos, la gluconeogénesis y la glicólisis de estos modelos han mostrado ser similares a los de los ratones *ob/ob* [226].

Los animales alimentados con estas dietas desarrollan obesidad a largo plazo, lo que causa la aparición de hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemia y niveles elevados de colesterol, en un proceso similar al que experimentan los humanos [214], [219]. Aunque la mayor desventaja de este modelo experimental es el tiempo necesario para que aparezca esta sintomatología [92], [214].

Por otro lado, también existen las dietas basadas en la adición de altas cantidades de fructosa o sacarosa, aunque a pesar de ser ambos sacáridos, no producen MetS de características comunes [219]. Así, mientras que los animales alimentados con dietas con alto contenido en fructosa consiguieron desarrollar un peso elevado, aumento de la adiposidad, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, colesterol, diabetes y menor sensibilidad a la insulina; los animales tratados con sacarosa no consiguieron desarrollar la diabetes, aunque sí tenían niveles de insulina elevados [227].

Al igual que existen estas dietas basadas en sacarosa y fructosa, también existen otro tipo de dietas en las que los animales son alimentados básicamente con carbohidratos. Debido a este tipo de alimentación y el estilo de vida sedentario de los animales, éstos tienden a acumular grasa y desarrollan obesidad, que les conduce a padecer MetS. En este caso, los animales desarrollan hipertensión, diabetes, obesidad y dislipidemia tras 16 semanas [219].

#### ii. Modelos experimentales de consumo de alcohol etílico

Los modelos animales experimentales son una potente herramienta en la investigación del abuso y dependencia del alcohol etílico, ya que permiten ver los efectos de este en los órganos, además de otros aspectos como la tolerancia al alcohol etílico y los desórdenes de conducta asociados a su consumo [228].

A la hora de seleccionar el modelo experimental, aunque hay algunas variantes genéticas más predispuestas al abuso de alcohol etílico, puede que sea más importante determinar el método de suministro de este. Por eso, podemos encontrar modelos voluntarios, entre los que se encuentran los motivacionales, en los que el animal toma la decisión de consumir alcohol etílico o métodos forzados en los que el animal no tiene otra alternativa [228].

Entre los métodos forzados, podemos encontrar la dieta Lieber-DeCarli [229], en la cual los animales son privados de comida y reciben los nutrientes a través de una solución dietética líquida que incluye un cierto contenido alcohólico. Otra de las alternativas es la utilización de inyecciones intraperitoneales para administrar la dosis de alcohol etílico [230], el uso de vapores de alcohol etílico que son administrados en la jaula para que el animal lo respire [231], [232] o la privación de bebidas sin contenido alcohólico *ad libitum* [228].

Entre los modelos voluntarios podemos destacar la elección entre dos botellas (*two bottle choice*, en inglés) [228], [231] en que los ratones pueden elegir entre beber de una botella con cierto contenido alcohólico o una botella con agua. En este grupo destacan los modelos motivacionales, en que el roedor, para poder consumir la bebida alcohólica necesita realizar algún tipo de esfuerzo, como accionar una palanca que le permita acceder al biberón [228].

En el caso de las bebidas alcohólicas, tanto en los métodos forzados como en los voluntarios, es usual el uso de edulcorantes como la sacarina para reducir el rechazo a beber por parte de los animales, así como ciertos periodos de habituación [228], [232].





## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**





El MetS se caracteriza principalmente por causar resistencia a la insulina, obesidad central, dislipidemia, hipertensión e intolerancia a la glucosa. Tal y como se ha explicado en el marco teórico, la obesidad produce dislipidemia y un aumento de FFA en el torrente sanguíneo, que se metabolizan en el hígado y producen un aumento del LDL, causando hipertensión. Además, el aumento de FFA en circulación causa resistencia a la insulina en los tejidos periféricos y un aumento de la gluconeogénesis, aumentando los niveles de glucosa en sangre.

Como resultado del aumento de los niveles de glucemia, las células beta secretan insulina debido a un cambio de polaridad de la membrana celular que estimula el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la exocitosis. Además, debido a la resistencia a la insulina y ante la demanda sostenida de este polipéptido, los islotes de Langerhans aumentan su capacidad de secreción de insulina mediante la transdiferenciación de células  $\alpha$  a células  $\beta$  y la hiperplasia de los islotes de Langerhans.

Esta situación genera mucho estrés a las células beta, por lo que aumenta la concentración de citoquinas proinflamatorias y se genera estrés oxidativo que, en última instancia, produce apoptosis celular y muerte de las células  $\beta$ , obteniéndose como resultado un estado diabético (T2D). El estrés oxidativo es muy dañino para los diversos órganos y sistemas, como el SNC, donde el estrés oxidativo se ha relacionado con degeneración neuronal y desajustes cognitivos.

Por otro lado, no existe consenso científico respecto al efecto que el consumo de alcohol etílico puede tener en pacientes diabéticos o con MetS. En la literatura se señala que el consumo de alcohol etílico está relacionado con un aumento de la probabilidad de sufrir MetS, aunque esta relación está asociada a un consumo abusivo de alcohol, mientras que el consumo moderado u ocasional podría estar relacionada con una reducción de la probabilidad de sufrir MetS [233]. El metabolismo del alcohol etílico genera acetaldehído

y estrés oxidativo, pero también se asocia con un menor riesgo de CVD y un aumento en la sensibilidad a la insulina debido a que estimula la secreción de insulina, y reduce la gluconeogénesis y la glucogenólisis, reduciendo los FFA en sangre.

A partir de este resumen se pueden extraer las siguientes premisas:

1. La resistencia a la insulina produce un aumento de la secreción de insulina para contrarrestar los efectos causados por la resistencia a su acción en tejidos periféricos y mantener la homeostasis de la glucosa.
2. El aumento de la secreción de la insulina genera estrés oxidativo que puede conducir a la apoptosis de las células  $\beta$ .
3. Existe controversia en la bibliografía sobre los efectos del consumo del alcohol etílico en relación con la T2D y al MetS.
4. El metabolismo del alcohol etílico genera estrés oxidativo que, entre otros, afecta al SNC.
5. El metabolismo del alcohol etílico tiene efectos en la secreción de la insulina en la célula  $\beta$ .

Con estas premisas, se plantea la siguiente hipótesis:

**Hipótesis:**

El consumo crónico de alcohol etílico produce una alteración del estado oxidativo en el cerebro ratones *ob/ob*, así como una modulación de la respuesta celular a la insulina.

**Objetivo General:**

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio del efecto combinado del MetS y el abuso del consumo de alcohol etílico sobre el estado oxidativo del SNC de ratones *ob/ob*.

Para conseguir este propósito, se establecen los siguientes objetivos secundarios:

1. Estudiar el efecto que el consumo crónico de alcohol etílico causa sobre la memoria a corto y largo plazo en un modelo animal de MetS.
2. Analizar los efectos que produce el abuso de alcohol etílico sobre la secreción y respuesta a la insulina en un modelo animal de MetS.
3. Valorar los efectos que produce el consumo crónico de alcohol etílico sobre el estado glucémico de ratones con MetS.
4. Determinar los efectos que produce el consumo crónico de alcohol etílico sobre el estado oxidativo del SNC en un modelo animal de MetS.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## a. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

El modelo animal de MetS seleccionado para llevar a cabo el estudio, fueron ratones macho deficientes en leptina, conocidos como ratones *ob/ob*, que son homocigóticos para la mutación de la leptina (B6.V-Lep<sup>ob/ob</sup>JRj) y los respectivos ratones macho control de la misma estirpe sin modificar genéticamente (B6.V-Lep<sup>ob/+</sup>JRj). Debido al déficit en leptina, estos ratones muestran obesidad, hiperfagia, hiperglucemia transitoria, intolerancia a la glucosa y elevados niveles de insulina en el plasma.

Los ratones utilizados en esta tesis doctoral tenían 4 semanas de edad cuando llegaron al Servicio de Experimentación Animal (SEA), donde se estabularon en cajas en grupos de cinco ratones. Los animales pasaron una semana en la sala de cuarentena y después se les trasladó a la sala de estabulación correspondiente una semana antes del inicio del suministro de alcohol etílico para que se acostumbrasen a las condiciones de la sala (temperatura 21±1°C y ciclo de luz/oscuridad de 12h, con el cambio de ciclo a las 8:00h y a las 20:00h). Los ratones tuvieron a su disposición bebida y alimento *ad libitum* durante todo el experimento.

A las seis semanas de edad, se empezó a suministrar alcohol etílico a los ratones progresivamente, empezando por un 2% (v/v) en el agua de bebida hasta un 12% (v/v), en aumentos progresivos de un 2% (v/v) cada 48h. Para evitar la aversión al gusto del alcohol etílico y facilitar la adaptación de los ratones a la bebida, se añadían unas gotas de sacarina (ciclamato sódico) en el biberón.

Al final de la fase experimental, los animales fueron sacrificados usando el método de la dislocación cervical. En el momento del sacrificio, se les extrajeron muestras de sangre y muestras de cerebro. Estas muestras se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se guardaron en un congelador a -80°C hasta el momento de su análisis. Antes de realizar

cualquier medida o prueba con los animales vivos, se dejaban 30 minutos antes en la sala donde iba a realizarse la medición para que se acostumbrasen a las condiciones de la sala.

#### i. Distribución temporal

El experimento se desarrolló en una fase para estudiar los efectos del abuso del alcohol etílico combinado con la patología del MetS tras **seis semanas** de ingesta.

#### ii. Tamaño y grupos muestrales

El cálculo del tamaño muestral se realizó en base a la diferencia esperada en la capacidad antioxidante total del sistema nervioso central para un error alfa del 20% y un error beta del 10%. Se obtuvo un tamaño muestral necesario de 60 ratones. Por ello, para nuestro estudio se usaron un total de 60 ratones, 30 sin modificar genéticamente y 30 ratones *ob/ob*.

Los ratones fueron divididos en los siguientes grupos experimentales:

- “Wild-Type” control (C): 15 ratones B6.V-Lep<sup>ob/+</sup>JRj con ingesta de agua durante todo el procedimiento.
- “Wild-Type” Alcohol etílico (E): 15 ratones B6.V-Lep<sup>ob/+</sup>JRj con ingesta de alcohol etílico diluido en agua durante todo el procedimiento.
- Control de MetS (Ob): 15 ratones B6.V-Lep<sup>ob/ob</sup>JRj con ingesta de agua durante todo el procedimiento.
- MetS Alcohol etílico (Ob-E): 15 ratones B6.V-Lep<sup>ob/ob</sup>JRj con ingesta de alcohol etílico diluido en agua durante todo el procedimiento.

#### iii. Requerimientos éticos

La presente tesis doctoral cuenta con la aprobación del Comité Ético de la Universitat Jaume I y de la autorización de la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca



de la Generalitat Valenciana, con código de proyecto 2019/VSC/PEA/0053 (Anexo I), en virtud del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

## b. REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS

El alcohol etílico calidad alimentaria fue suministrado por la empresa Panreac (Barcelona, España). Este alcohol fue el que se administró a los ratones en el agua de bebida.

Para preparar las disoluciones de trabajo, reactivos y stocks se utilizaron los siguientes productos e instrumental:

- Dihidrogenofosfato potásico, hidrogenofosfato potásico, glutatión disulfuro u oxidado (GSSG), glutatión reducido (GSH), L-Cisteína, Ácido Glutámico, 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB), ácido yodoacético, ácido perclórico, acetato sódico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ), glutatión disulfuro reductasa (GR), peróxido de hidrógeno 30%, ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), hidrogenofosfato sódico, dihidrogenofosfato sódico, ácido 2-tiobarbitúrico y 1,1,3,3-tetrametoxipropano suministrados por Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania).
- Metanol, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y ácido acético glacial se compraron a la empresa Scharlab (Barcelona, España).
- El agua ultrapura para la preparación de los tampones y disoluciones se obtuvo de un sistema de purificación de agua para laboratorio Milli-Q Advantage A10 de la marca Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

- El pH de las disoluciones se midió usando un pH-metro pH700 (EUTECH Instruments, empresa del grupo Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) y los pesos se pesaron usando una balanza analítica LA611-2264 (VWR, Radnor, PA, Estados Unidos) y una balanza PGL 6001 (ADAM Equipment, Oxford, CT, Estados Unidos), según la cantidad a pesar.

### c. GLUCEMIAS, SOBRECARGA GLUCOSA, INSULINEMIAS

#### i. Glucemias

Para controlar el estado general de los ratones, semanalmente se monitorizaba el contenido de glucosa en sangre (glucemias) de los ratones, el peso y el consumo de bebida durante todo el experimento.

El control de peso se realizaba pesando los ratones en una balanza de precisión PFB-2017 (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Alemania). El control de los niveles de glucosa se llevaba a cabo extrayendo 1  $\mu$ L de sangre de la cola de los ratones y midiendo el contenido de glucosa usando un glucómetro ACCU-CHECK (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza).

El consumo de líquidos por parte de los ratones se realizaba promediando el consumo de bebida en cada una de las cajas de los ratones entre el número de ratones que había en la caja.

#### ii. Sobrecarga de glucosa

La prueba de sobrecarga de glucosa es un test utilizado comúnmente para diagnosticar la diabetes y las alteraciones metabólicas relacionadas, como la resistencia a la insulina. Esta prueba, que se realiza mediante una administración de glucosa oral en ayunas para los humanos, ha sido adaptado para los ratones mediante la administración intraperitoneal de glucosa (2 g/Kg) tras 12h de ayuno. Posteriormente, se midieron los niveles de glucosa

en sangre después de 30, 60 y 120 minutos y los datos se representaron cómo incremento porcentual respecto de la glucemia basal (tiempo 0 minutos).

### iii. Insulinemias

Se establecieron los niveles de insulina en sangre, mediante el análisis de sangre obtenida por decapitación en el momento del sacrificio en un kit inmunoenzimático ELISA suministrado por la empresa Merck (Dramstad, Alemania).

Este kit ELISA está basado en la técnica «Sándwich» en el que en un primer paso se capturan las moléculas de insulina en los pocillos de una placa de 96 pocillos con unos anticuerpos monoclonales de insulina anti-rata/ratón. Posteriormente se elimina el material que no se ha unido a los anticuerpos y se añade una nueva capa con una enzima que reacciona con el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. La actividad enzimática se mide espectrofotométricamente a 450 nm y a 590 nm. La diferencia en la absorbancia a estas dos longitudes de onda es proporcional a la cantidad de insulina presente en la muestra, que se compara con una curva patrón de concentraciones conocidas de insulina de rata.

### iv. Determinación de niveles de alcohol etílico en sangre

El nivel de alcohol etílico en sangre de los ratones en el momento previo del sacrificio se obtuvo usando un kit fluorimétrico de ensayo de alcohol etílico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

### v. Test conductuales

Para evaluar los efectos cognitivos del abuso de alcohol etílico en el modelo experimental, se usó el *Novel Object Recognition Test* (test de reconocimiento de objetos nuevos). Este test, es una de las pruebas de conducta y memoria más comúnmente utilizados en ratones [234]. Entre las características de esta prueba destacan la no inclusión ningún estímulo o

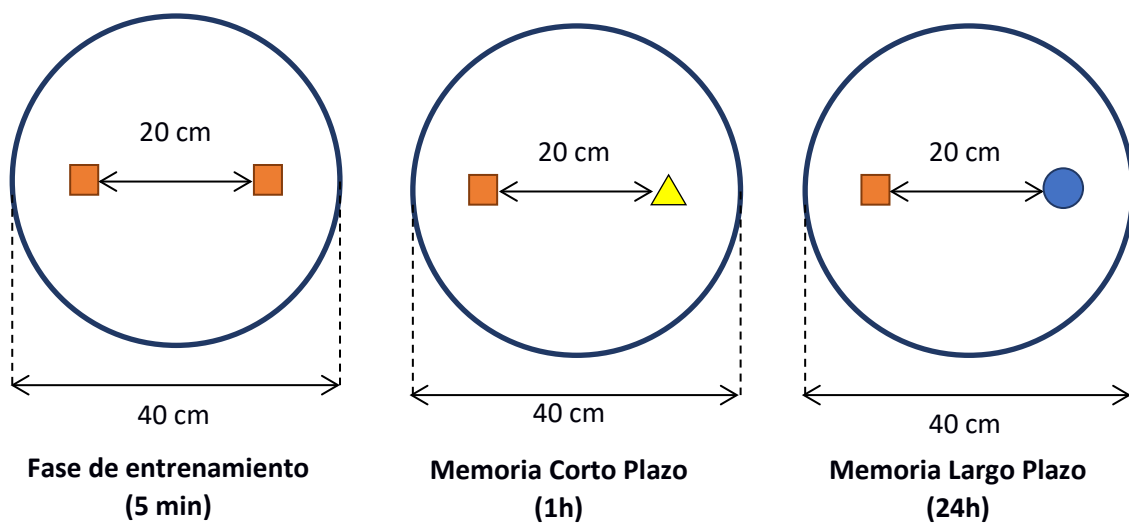
refuerzo externo como comida o descargas eléctricas, por lo que es comparable a las pruebas de memoria realizados habitualmente en humanos. Además, es similar a los test de reconocimiento visual de objetos en primates y aprovecha el comportamiento espontáneo de los ratones; por lo que puede considerarse un test de los procesos cognitivos puros de los roedores, ya que está libre de patrones de memoria y comportamiento previos al test [235]. Debido a estas características, el uso del *Novel Object Recognition Test* permite comparar los resultados entre distintos estudios, independientemente de la especie o cepa utilizada, además de permitir la adaptación del método a las características del experimentador [234], [235].

El *Novel Object Recognition Test* se basa en la tendencia natural de los ratones de explorar los objetos de su entorno, especialmente aquellos que son nuevos. Dependiendo del tiempo que pasan los roedores explorando cada uno de los objetos, se pueden establecer relaciones de memoria, preferencia por objetos nuevos, influencia de las regiones cerebrales en los procesos cognitivos de reconocimiento o efectos farmacológicos en el desarrollo de fármacos y drogas [236]. A pesar del uso extendido de este test, los mecanismos cerebrales concretos que intervienen continúan sin estar plenamente definidos [237].

En nuestro caso, se ha usado esta prueba para evaluar la memoria a corto plazo y largo plazo de los ratones tras el consumo abusivo de alcohol etílico, así como los efectos sobre el comportamiento de la ingesta de alcohol etílico.

Para llevar a cabo el ensayo, en el suelo de una sala con luz tenue se colocaron unos cilindros de PVC de 40 cm de diámetro, cuyas bases se rellenaron con serrín. En el interior de los cilindros se introdujeron dos bloques de construcción de color rojo suficientemente pesados para que los ratones no los moviesen del sitio y separados 20 cm uno de otro. Después, se introdujo un ratón en el centro del cilindro y se le permitió que explorase el

entorno libremente durante cinco minutos (fase de entrenamiento). Pasado ese tiempo, se devolvió el ratón a su caja. Una hora (1h) después de la finalización de la sesión de entrenamiento, se volvió a poner el ratón en el centro del cilindro para que explorase de nuevo el entorno durante cinco minutos, con la única diferencia de que uno de los bloques de color rojo había sido cambiado por otro bloque de forma distinta de color amarillo (evaluación de memoria a corto plazo). A las 24 horas del fin de la sesión de entrenamiento, se volvió a dejar al ratón en el centro del cilindro para que explorase de nuevo el entorno durante cinco minutos. Esta vez, el bloque amarillo había sido cambiado por otro bloque de color azul para evaluar la memoria a largo plazo. Las condiciones experimentales pueden observarse en la siguiente figura (Figura 7):



**Figura 7: Condiciones experimentales para el *Novel Object Recognition Test*.**

El comportamiento de los ratones se monitorizó mediante grabación con una cámara situada sobre el cilindro, para evitar la presencia de los investigadores y la perturbación que esta puede ocasionar en el comportamiento del ratón. Los bloques se lavaban con alcohol etílico 70% y se secaban después de cada prueba individual para evitar que el olor propio de los roedores alterase el comportamiento del ratón bajo observación. Como

medida básica en el test de reconocimiento de objetos, se usó el índice de discriminación (ecuación 1) [153], en el que  $t$  representa las exploraciones realizadas por los ratones sobre los objetos utilizados en la fase de entrenamiento (familiar o desconocidos-novel). Para considerar como válida una exploración, el ratón debía de aproximarse al objeto y orientar el hocico hacia el objeto, en una distancia inferior a 2 cm de este. Además, no se consideraban exploraciones cuando el animal se sentaba encima del objeto o cuando pasaba cerca del objeto sin orientar el hocico hacia él. Los índices de discriminación en que  $t_{\text{novel}} - t_{\text{familiar}} \leq 0$  se tomaron como DI = 0%.

$$D. I. = \frac{(t_{\text{novel}} - t_{\text{familiar}})}{(t_{\text{novel}} + t_{\text{familiar}})} \times 100\%$$

**Ecuación 1: Ecuación índice de discriminación**

vi. Homogenado de las muestras

Para poder realizar los métodos de análisis enzimáticos y moleculares, se requiere disgregar el tejido y homogeneizar las muestras.

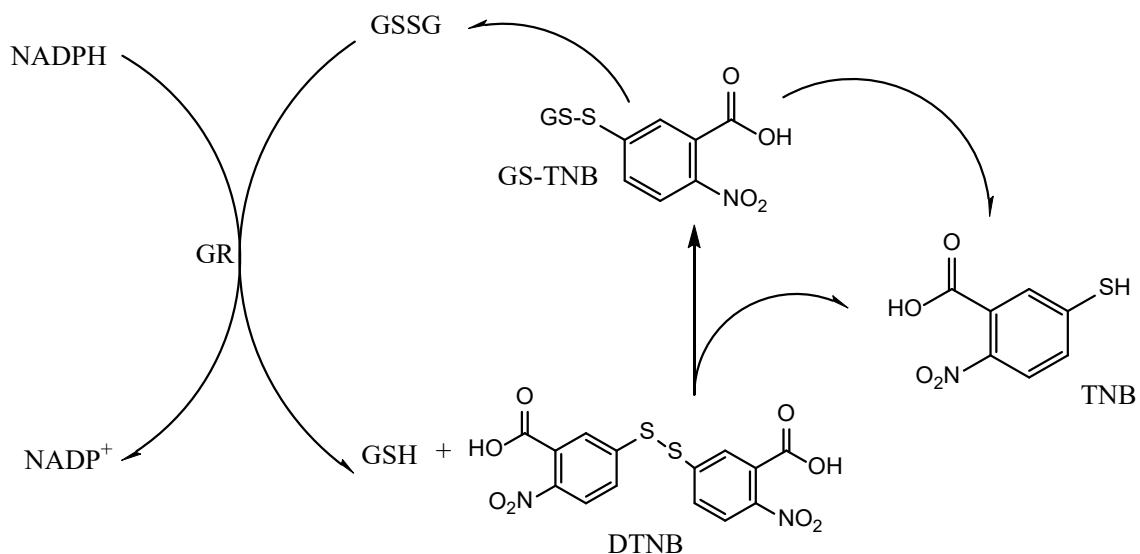
A las muestras de cerebros, tras descongelarse en hielo, se les añadió 2 mL de tampón fosfato potásico 0,1M y pH 7 y se homogeneizaron en un homogeneizador ultraturax Polytron PT2500e (Kinematica AG, Lucerna, Suiza) a 30.000 rpm durante 1 minuto. Después se centrifugan las muestras a 14.000 rpm durante 1 minuto en una centrífuga refrigerada Mikro 220R (Hettich Holding GmbH & Co. oHG, Kirchleugern, Alemania) para eliminar los sedimentos. El sobrenadante resultante, antes de congelarlo hasta su uso, se distribuye en distintas alícuotas para los análisis correspondientes: MDA (200  $\mu$ L), GPx y GR (200  $\mu$ L), GSH (180  $\mu$ L) y resto, que se guarda por si hay que repetir algún experimento. A la alícuota que se usará para medir el GSH y GSSG, se añaden 20  $\mu$ L de ácido perclórico 20% (PCA) para precipitar proteínas. Tras esta precipitación, las muestras se centrifugaron 15 minutos a 12.000 rpm.

vii. Métodos enzimáticos

a. Determinación de la actividad Glutación Reductasa

La determinación de la actividad de la enzima Glutación Reductasa (GR) (E.C.1.8.1.7) se llevó a cabo usando el método propuesto por Smith [238]. Este método se basa en la reducción del ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) por el GSH.

La glutación reductasa reduce el GSSG presente en la muestra en presencia de NADPH. En presencia del ácido DTNB, el glutación reducido rompe el DTNB y forma un aducto con el ácido 2-nitro-5-sulfanilbenzoico (GS-TNB), que luego descompone en el TNB (ácido 2-nitro-5-sulfanilbenzoico). La aparición de este ácido puede seguirse espectrofotométricamente con una longitud de onda de 412 nm.



**Figura 8. Reacción de reducción del ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) por el GSH.**

El procedimiento analítico consistía en la adición en una cubeta de 1 mL de 450  $\mu$ L de tampón fosfato sódico 0.2 M, pH 7,5; 50  $\mu$ L de EDTA 10 mM; 250  $\mu$ L de una disolución DTNB 3 mM preparado en tampón fosfato sódico 10 mM a pH 7,5; 50  $\mu$ L de NADPH 2 mM y 50  $\mu$ L de GSSG 20 mM y 125  $\mu$ L de agua ultrapura. Durante dos minutos, se monitorizaba la reacción de reducción del GSSG y la formación del TNB, que empezaba

con la adición de 25  $\mu\text{L}$  de muestra a la cubeta con el resto de las disoluciones. La temperatura se mantuvo a  $37^{\circ}\text{C}$  durante todas las mediciones usando un baño termostático de temperatura regulable de Selecta modelo Tectron 3471300 (J.P. Selecta, Abrera, Barcelona) y las medidas de absorbancia se hicieron usando espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis (Waltham, MA).

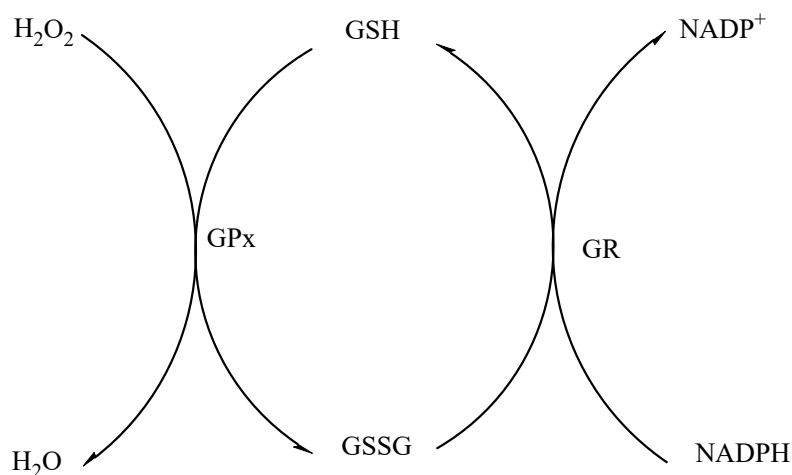
El cálculo de la actividad GR se realiza por comparación de la pendiente de la recta obtenida por la aparición del TNB (recta de Absorbancia (Y) frente a tiempo (X)) con un calibrado previo, en que se sustituye la muestra por distintos volúmenes de glutatión reductasa (GR 1 UI/mL), ajustando el volumen de agua para tener 1 mL de líquido en la cubeta. Para poder realizar comparaciones entre muestras, los resultados se normalizaban dividiendo por la cantidad de proteínas presentes.

#### *b. Determinación de la actividad Glutatión Peroxidasa*

La determinación de la actividad de la enzima Glutatión Peroxidasa (GPx) (E.C. 1.11.1.9) se llevó a cabo usando el método propuesto por Lawrence [239]. Este método se basa en la eliminación en los sistemas biológicos del peróxido de hidrógeno por acción de la enzima glutatión peroxidasa.

En presencia de peróxido de hidrógeno, la enzima glutatión peroxidasa reduce el peróxido de hidrógeno a agua, al tiempo que oxida el GSH a GSSG. Este GSSG, a su vez se reduce por acción de la GR para formar de nuevo GSH. La reducción del GSSG requiere de la oxidación del NADPH a  $\text{NADP}^+$ , que puede ser registrada espectrofotométricamente utilizando una longitud de onda de 340 nm.





**Figura 9. Reacción de reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la enzima GPx.**

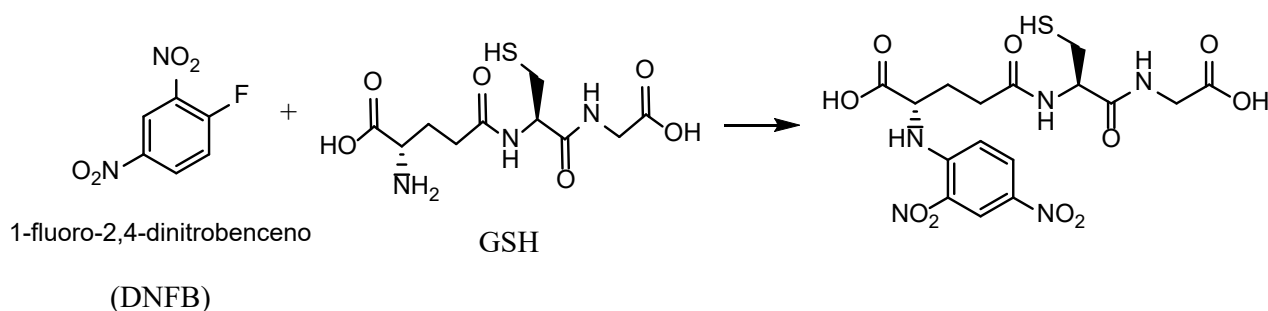
El procedimiento analítico consiste en la adición en una cubeta con volumen total 1 mL de 25  $\mu$ L del homogenado de la muestra, 500  $\mu$ L de tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 7, que contiene EDTA 1 mM y azida sódica (NaN<sub>3</sub>) 1 mM; 100  $\mu$ L de una disolución 1 UI/mL de GR preparada en tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 7; 100  $\mu$ L de una disolución GSH 10 mM preparada en tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 7 y 75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura. Esta disolución se incubó a 37°C durante 5 minutos, tras los que se añadieron 100  $\mu$ L de una disolución NADPH 1,5 mM preparada en NaHCO<sub>3</sub> al 0,1%. Una vez añadida esta disolución, se empezó la monitorización de la muestra a 340 nm a 37°C. A los 3 minutos, se añadían 100  $\mu$ L de una disolución de peróxido de hidrogeno 1,5 mM preparada en tampón fosfato potásico 0,1M a pH 7, momento en que empezaba la oxidación del NADPH que era monitorizada a 340 nm durante 5 minutos más.

El cálculo de la actividad GPx se realizaba por comparación de la pendiente de la recta obtenida por la desaparición del NADPH (recta de Absorbancia (Y) frente a tiempo (X)), con la pendiente obtenida con un blanco de tampón fosfato potásico 0,1M pH 7. Para poder realizar las comparaciones entre muestras, los resultados se normalizaban dividiendo por la cantidad de proteínas presentes.

## viii. Métodos moleculares

### a. GSH, GSSG

La determinación de las concentraciones del glutatión disulfuro (GSSG), del glutatión reducido (GSH) y de sus precursores (L-Cisteína) se llevó a cabo usando el método propuesto por Reed y sus colaboradores [240]. Este método se basa en la reacción de las aminas terminales de los aminoácidos con el reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno o DNFB). El DNFB es detectable espectrofotométricamente a 365 nm y, además, aumenta la capacidad de separar los aminoácidos cromatográficamente.



**Figura 10. Reacción del reactivo de Sanger con el GSH.**

El proceso analítico consistía en la derivatización previa de las muestras para introducir el grupo cromóforo y la posterior detección en un sistema de cromatografía líquida HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). Primero, a una alícuota del homogenado de las muestras con PCA (180  $\mu$ L muestra + 20  $\mu$ L PCA 20%), se le añadieron 40  $\mu$ L de una disolución ácido yodoacético 100 mM y 0,2 mM en m-cresol purple. Este primer paso, bloquea los grupos tiol de los aminoácidos que forman el GSH y el GSSG. Posteriormente, para neutralizar el exceso de ácido, se añadían 60  $\mu$ L de un tampón  $\text{KHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$  2,5 M, hasta llegar a pH 9. La adición del tampón producía un cambio de color, de rojo a morado. Tras 30 minutos de incubación en oscuridad en un baño de hielo, se añadieron 200  $\mu$ L de DNFB y se ajustó de nuevo el pH al añadir 20  $\mu$ L de tampón  $\text{KHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$ . El color de la muestra cambiaba a color amarillo verdoso y se dejaba

incubar toda la noche en el interior de una nevera a 4°C. Al día siguiente, se centrifugaban las muestras a 13.000 rpm durante 10 minutos para eliminar los precipitados, se filtraban con un filtro de nylon de 0.22 µm y se preparaban en viales para la posterior inyección de 50 µL de muestra en el sistema HPLC. Diariamente se preparaban curvas patrón y se derivatizaban al mismo tiempo que las muestras.

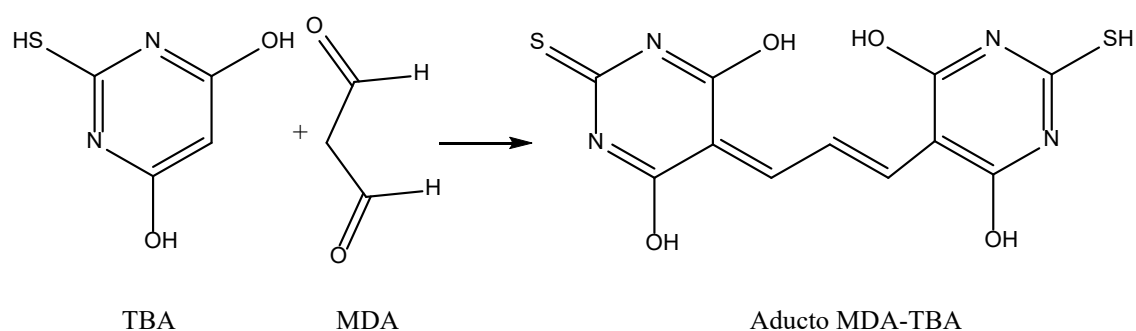
El sistema HPLC era un cromatógrafo líquido de alta presión serie 1100 de Agilent Technologies (Santa Clara, California) equipado con una bomba cuaternaria, desgasificador, detector de diodos (DAD), termostatizador de columna e inyector con un loop de 100 µL. Para el análisis de los datos se usó un ordenador IBM Windows 2000 Pro (Microsoft corporation, Redmond, WA) equipado con el software HP ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, California). La separación se llevó a cabo usando una columna cromatográfica Kromasil-NH<sub>2</sub>, 250 x 4,6 mm 5 µm (Waters Corporation, Mildford, MA, USA), con un flujo de 1 mL/min a 25°C. Las fases móviles consistían en una mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O (4:1, v/v) (Fase móvil A) y una mezcla Metanol-tampón acetato sódico/ácido acético 3,45 M (64:36) (Fase móvil B). La bomba cuaternaria trabajaba en modo gradiente, siendo 20% B al inicio de la inyección hasta los 10 minutos y aumentando a partir de este punto hasta 80% B a los 45 minutos. Para la detección de los compuestos se configuró el detector para que registrase espectros a una longitud de onda de 365 nm.

#### *b. MDA*

La determinación del daño celular se realizó a través de la cuantificación del malondialdehído (MDA) con el método propuesto por el equipo de Richard [241] con las modificaciones introducidas por Romero y sus colaboradores [242]. Este método se basa en la reacción de condensación del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el MDA,

produciéndose un compuesto cromóforo que puede determinarse espectroscópicamente por fluorescencia.

El proceso analítico consistía en la derivatización de 100  $\mu\text{L}$  del homogenado de la muestra con 750  $\mu\text{L}$  de una disolución de TBA 0,37% y 6,4% en PCA a 95°C durante 1 hora. Pasado este tiempo, se paraba la derivatización enfriando las muestras en hielo, se tomaban 300 $\mu\text{L}$  de la muestra derivatizada y se ajustaba el pH a 6 usando KOH 1M. Posteriormente se centrifugaba la muestra a 10.000 rpm durante 1 minuto y se filtraban las muestras con un filtro de jeringa de nylon de 22  $\mu\text{m}$ . Finalmente, se inyectaban 20  $\mu\text{L}$  de muestra en el sistema HPLC. Diariamente se preparaban los patrones a partir de una disolución madre con 1,1,3,3-tetrametoxipropano 40 mM en alcohol etílico.



**Figura 11. Reacción de derivatización del MDA**

El sistema HPLC era un cromatógrafo líquido de alta presión serie 1100 de Agilent Technologies (Santa Clara, California) equipado con una bomba cuaternaria, desgasificador, detector de fluorescencia (FLD) con una celda de 8  $\mu\text{L}$ , termostizador de columna e inyector con un loop de 100  $\mu\text{L}$ . Para el análisis de los datos se usó un ordenador IBM Windows 2000 Pro (Microsoft corporation, Redmond, WA) equipado con el software HP ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, California). La separación se llevó a cabo usando una columna cromatográfica Kromaphase C18, 150 x 4,6 mm 5  $\mu\text{m}$  (Scharlab, Barcelona, España), con un flujo de 1 mL/min a 40°C. La fase móvil consistía en una mezcla MeOH:Tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6 (42:58). La

bomba cuaternaria trabajaba en modo isocrático y el detector se configuró para que emitiera energía de excitación a 527 nm de longitud de onda y detectara la emisión a una longitud de onda de 551 nm.

#### ix. Contenido de proteínas

Los niveles de proteínas en los homogenizados de tejidos cerebrales de los ratones se determinaron usando el Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ de Thermo Fisher Scientific.

Este kit de determinación se basa en la detección colorimétrica de Cu (I) a 560 nm. Cuando las proteínas entran en contacto con un medio alcalino en presencia de Cu (II), se produce la reducción de Cu (II) a Cu (I) (reacción de Biuret). Este Cu (I) es secuestrado por dos moléculas de ácido bicinconínico (BCA), formando un complejo de color morado que es proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra [243], [244]. La determinación se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos y la lectura espectrofotométrica se llevó a cabo usando un Lector de placas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

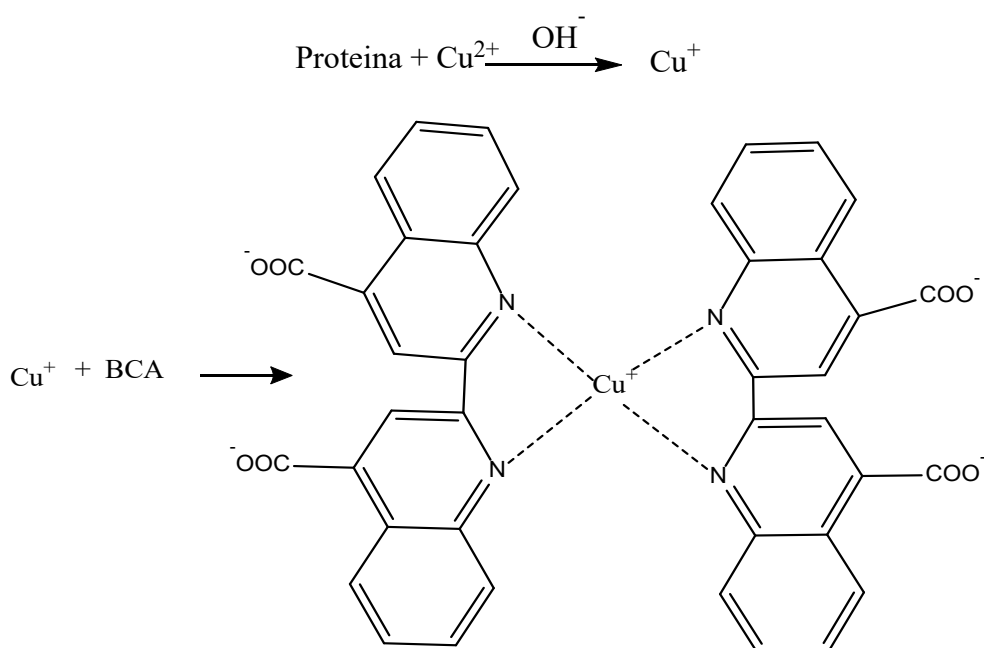


Figura 12. Reacción de formación del complejo Cu (I)-BCA.

#### x. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS (IBM SPSS Statistics para Windows, Version 25.0 IBM Corp, Armonk, NY, USA).

Realizamos en primer lugar un análisis descriptivo de cada variable estudiada y estudiamos la normalidad de sus distribuciones con el test de Kolmogorov.

La medida de tendencia central utilizada en el presente trabajo fue la media aritmética, que se define como la suma de los datos dividida por el número de casos. La medida de dispersión de los datos utilizada fue el error estándar de la muestra.

Las comparaciones entre los distintos grupos se llevaron a cabo usando un test ANOVA de un factor para los valores de GR, GPx, GSH, GSSG; relación GSH/GSSG, MDA, L-Cisteína, *Novel Object Recognition Test* y para los valores de insulina y ANOVA de dos factores para medidas repetidas para los pesos, glucemias y sobrecarga de glucosa. El análisis de la varianza de los datos obtenidos se realizó usando el test de Levine, usando el test LSD como test post hoc cuando las muestras mostraban homogeneidad en sus varianzas ( $p < 0.05$ ) o el test de Dunnett T3 cuando las varianzas no eran homogéneas. La significación estadística se estableció en un nivel  $p < 0.05$ .







## **RESULTADOS**



## a. NIVELES DE ALCOHOL ETÍLICO EN SANGRE Y MORTALIDAD

Con el objetivo de conocer la cantidad de alcohol etílico en sangre que tenían los ratones de los grupos con alcohol etílico y validar el protocolo de administración de alcohol etílico, y ante la imposibilidad de hacer un seguimiento continuo de este parámetro, se realizó la medición de la concentración de alcohol etílico en sangre utilizando sangre extraída en el momento del sacrificio.

Los niveles de alcohol etílico en sangre fueron  $108,5 \pm 18$  mg/dL y  $95,6 \pm 22,6$  mg/dL para los grupos E y Ob-E, respectivamente, mientras que no se detectaron niveles de alcohol etílico en sangre para los grupos control (C y Ob). Las concentraciones de alcohol etílico en sangre de los grupos alcohol no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Durante el procedimiento experimental, se produjo la muerte de 5 de los 15 ratones que formaban el grupo Ob. Los ratones fallecidos presentaban un histórico de valores de hiperglucemia. Sin embargo, no se observaron fallecimientos en ninguno de los otros tres grupos de estudio, a pesar de contar con valores elevados de glucemia.

## b. EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN EL PESO

Dado que el consumo crónico de alcohol etílico puede producir malnutrición debido a la sustitución de nutrientes por la ingesta de alcohol etílico y pérdida de apetito, se monitorizaron los pesos de los ratones a lo largo de todo el experimento, tomándose medidas del peso de cada ratón cada semana.

Como se observa en la Figura 13, existen diferencias significativas entre los grupos “wild-type” (C, E) y los grupos MetS (Ob, Ob-E). Estas diferencias se obtuvieron mediante un análisis ANOVA de dos vías para medidas repetidas, para una significación del 95%. Sin embargo, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos alcohol y sus respectivos grupos control.

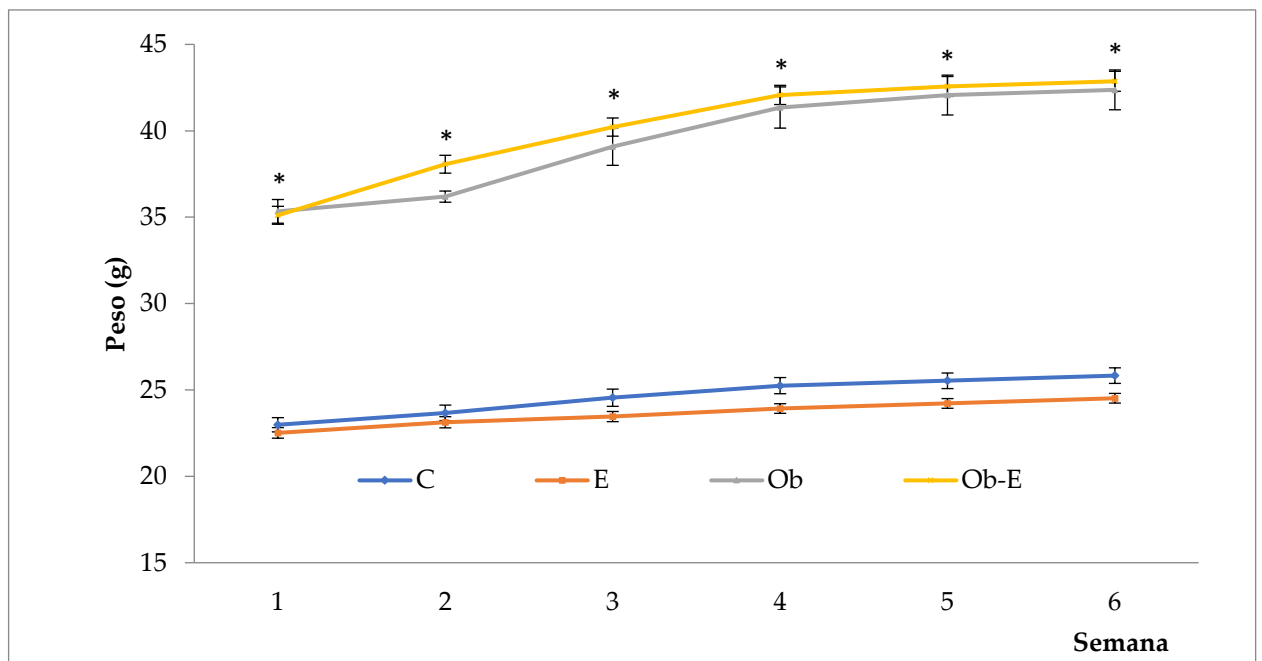


Figura 13. Evolución semanal del peso de los ratones (\* $p < 0,05$  Ob-E y Ob vs C y E).

## c. EFECTOS DEL ALCOHOL ETÍLICO EN LA GLUCEMIA

### BASAL

A la vez que se realizaban las mediciones del peso de los ratones, también se realizaba un control de su estado glucémico. Así, se registraba la concentración de glucosa en sangre de manera semanal.

De la misma manera que en el peso, el análisis de las varianzas de los resultados para el 95% de confianza y dos vías para medidas repetidas muestra diferencias significativas entre los grupos “wild-type” (C, E) y los grupos MetS (Ob, Ob-E) en la semana 1.

A partir de la semana 2 y hasta el final del experimento, el grupo Ob-E muestra una reducción significativa de los valores de glucemia en comparación con el grupo Ob, llegando a valores comparables a los grupos E y C (Figura 14).

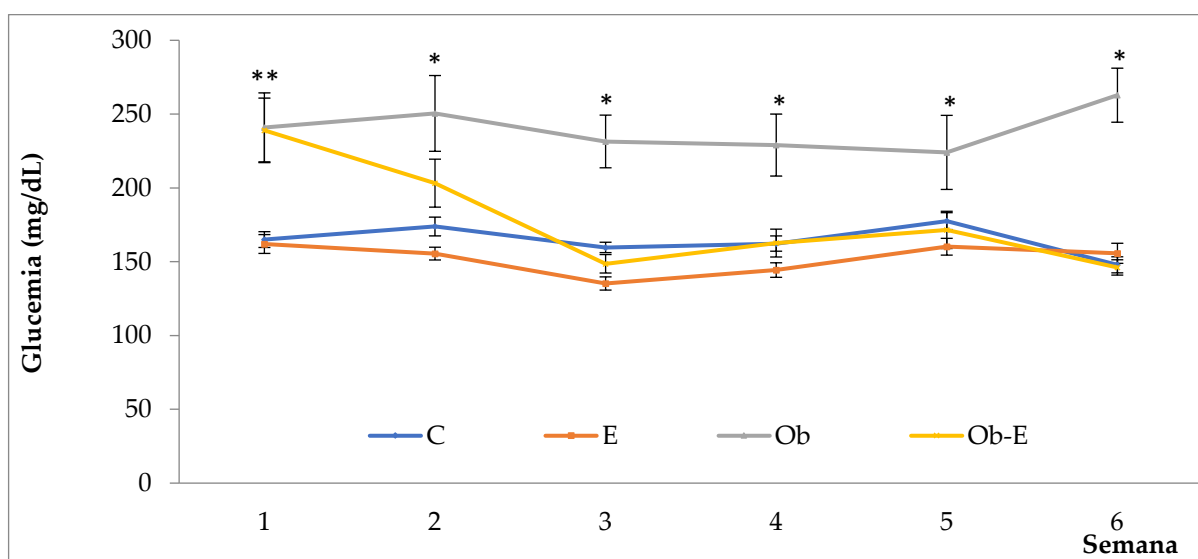


Figura 14. Glucemia basal semanal (\* $p < 0.05$  vs. resto de grupos, \*\*  $p < 0.05$  vs. C y E).

#### d. EFECTOS DEL ALCOHOL ETÍLICO EN LA CONCENTRACIÓN DE INSULINA

Con la sangre recogida en el momento del sacrificio, se realizó un ELISA para determinar los niveles de insulina en sangre de los cuatro grupos de estudio (C, E, Ob y Ob-E). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, que mostró diferencias significativas en las concentraciones de insulina entre los grupos “wild-type” (C, E) y los grupos MetS (Ob, Ob-E), para un nivel de significación del 95%, tal y como se observa en la Figura 15.

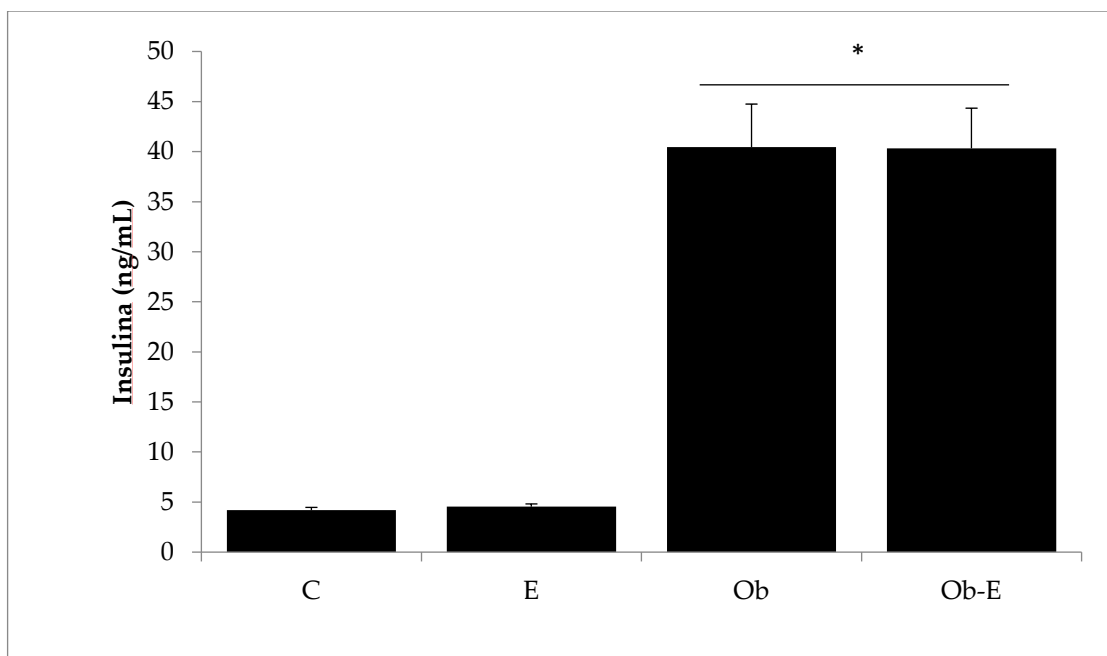
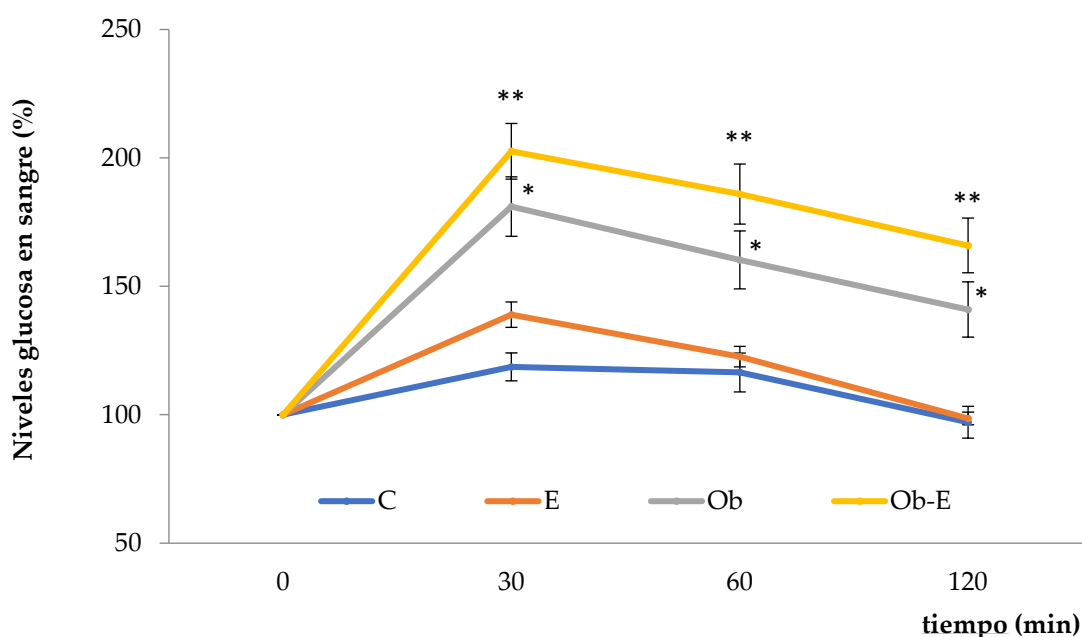


Figura 15. Niveles de insulina en sangre (\* $p < 0.05$  vs. C y E).

### e. EFECTOS DEL ALCOHOL ETÍLICO EN LA PRUEBA DE SOBRECARGA DE GLUCOSA

Para poder valorar los efectos del consumo de alcohol etílico en el metabolismo de la glucosa, se realizó el test de sobrecarga de glucosa a los ratones el día anterior al sacrificio. En la gráfica, pueden verse los resultados en incremento porcentual sobre la glucosa basal (a tiempo 0), una vez transcurridos 30, 60 y 120 minutos del inicio de la prueba de sobrecarga (Figura 16).

Estos resultados fueron analizados mediante un análisis ANOVA de dos vías para medidas repetidas, que mostró diferencias significativas entre el grupo MetS (Ob y Ob-E) frente al grupo “wild-type” (C y E), para una significación del 95%. Así pues, los grupos MetS presentan mayores aumentos en los niveles de glucosa en sangre que los “wild-type”. Mientras que en el grupo “wild-type” no hay diferencias significativas entre los grupos C y E, se observaron diferencias significativas en animales Ob-E del grupo MetS.



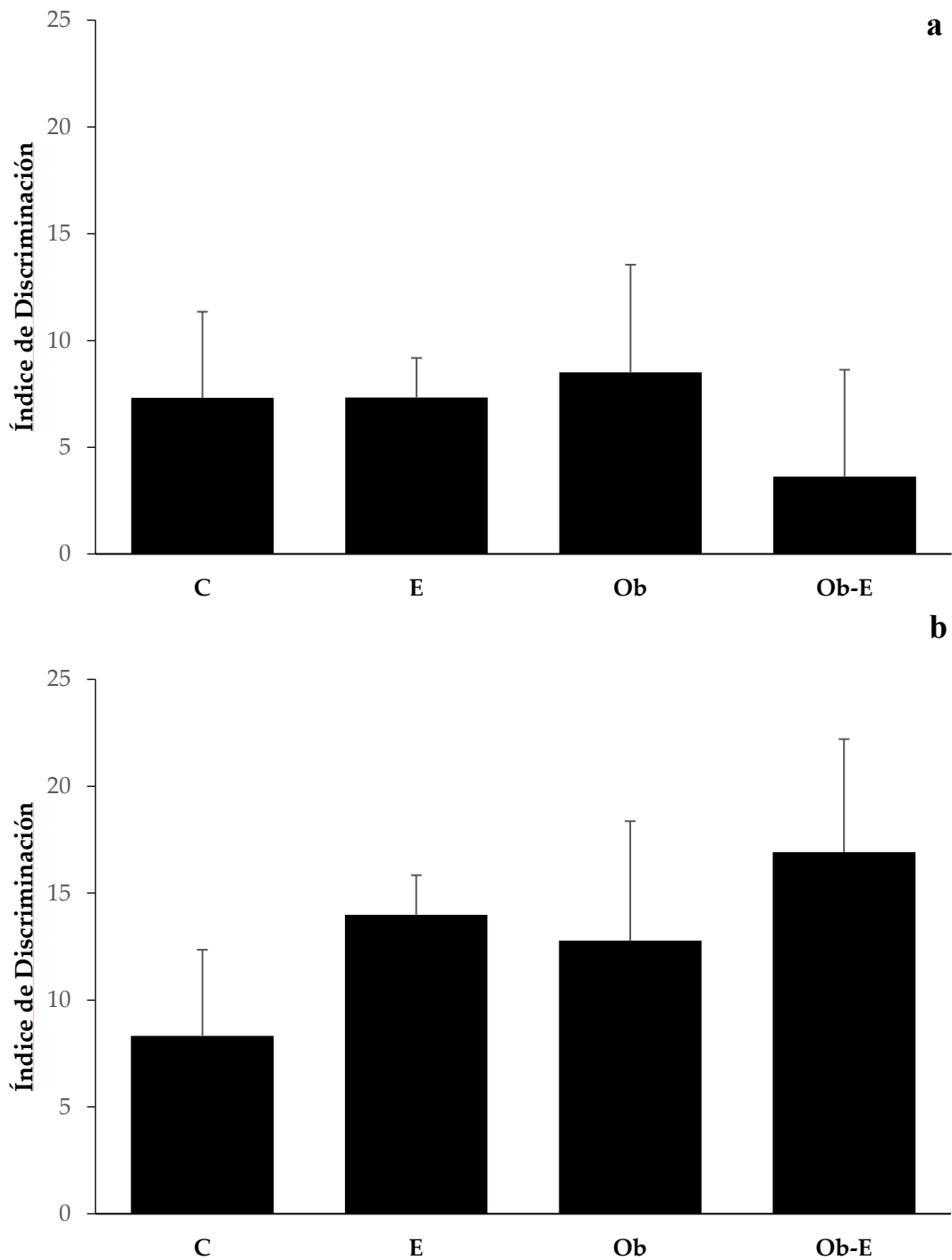
**Figura 16. Niveles de glucosa en sangre durante el test de sobrecarga de glucosa (%) (\*\*p<0.05 vs todos los grupos, \*p<0.05 Ob vs C y E).**

## f. EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA MEMORIA A LARGO Y CORTO PLAZO EN ANIMALES CON METS

Para determinar si ha habido alteraciones cognitivas causadas por el consumo de alcohol etílico, se realizó el *Novel Object Recognition Test* (test de reconocimiento de objetos nuevos) a los cuatro grupos de ratones (C, E, Ob y Ob-E).

Tal y como se observa en la figura, no se apreciaron diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio para el corto plazo (Figura 17.a) ni para el largo plazo (Figura 17.b).



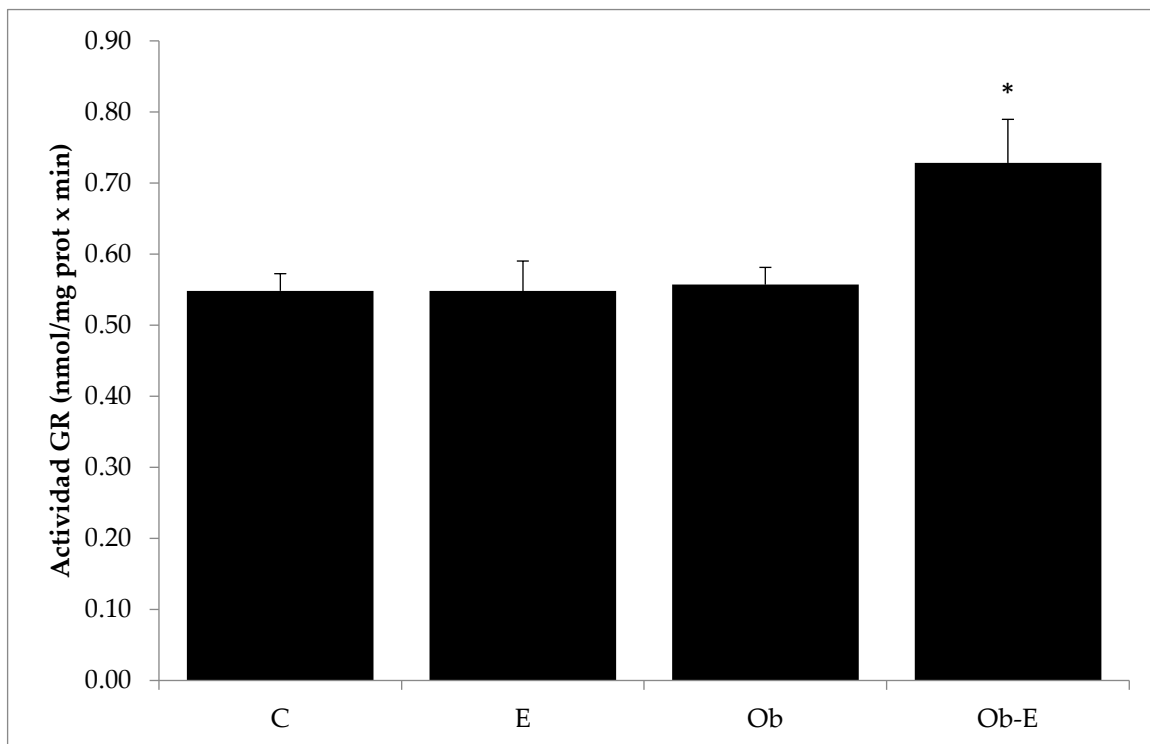


**Figura 17.** Efecto del consumo crónico de alcohol etílico reflejado en el reconocimiento de objetos nuevos. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar del índice de discriminación evaluado a 1h (memoria a corto plazo) (a) y a 24h (memoria a largo plazo) (b). El índice de discriminación se define como  $D.I. = (t_{\text{novel}} - t_{\text{familiar}}) / (t_{\text{novel}} + t_{\text{familiar}}) \times 100\%$ . C, “wild-type” control; E, “wild-type” alcohol etílico; Ob, Ob control; Ob-E, Ob-alcohol etílico.

g. EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA  
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA  
(GR) Y GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx)

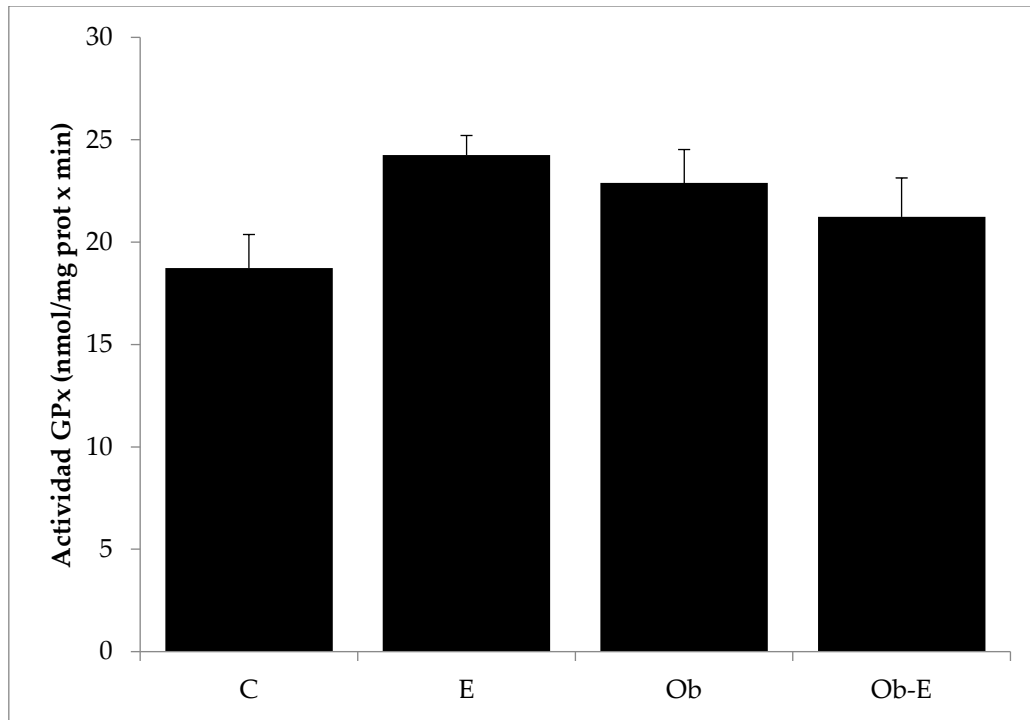
Para determinar el daño oxidativo causado por el consumo de alcohol etílico se estudió la actividad de las enzimas GPx y GR, relacionadas con la activación de la defensa antioxidante en la célula.

Así, en la Figura 18 se puede observar la actividad enzimática GR para cada uno de los grupos de estudio, representada por barras que muestran el valor medio  $\pm$  desviación estándar. El test ANOVA de una vía mostró diferencias significativas con un nivel de significación del 95%. Las comparaciones Post Hoc mostraron un nivel de actividad GR mayor en el grupo Ob-E que el resto de los grupos.



**Figura 18. Actividad GR para los grupos C (control “wild-type”), E (“wild-type” alcohol etílico), Ob (Control Ob) y Ob-E (Ob alcohol etílico) (\*p<0.05 vs resto de grupos).**

En cuanto a la actividad GPx, los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio, tal y como se observa en la Figura 19, donde se muestra la actividad GPx en barras que representan la media  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 19. Actividad GPx para los grupos C (control “wild-type”), E (“wild-type” alcohol etílico), Ob (Control Ob) y Ob-E (Ob alcohol etílico).**

## h. EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA CONCENTRACIÓN DE GSH

Tras finalizar el experimento, se midieron las concentraciones de GSH en las muestras de cerebro de ratón. La Figura 20 muestra las concentraciones obtenidas  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico ANOVA no mostró diferencias significativas entre los valores de los cuatro grupos de estudio (C, E, Ob y Ob-E).

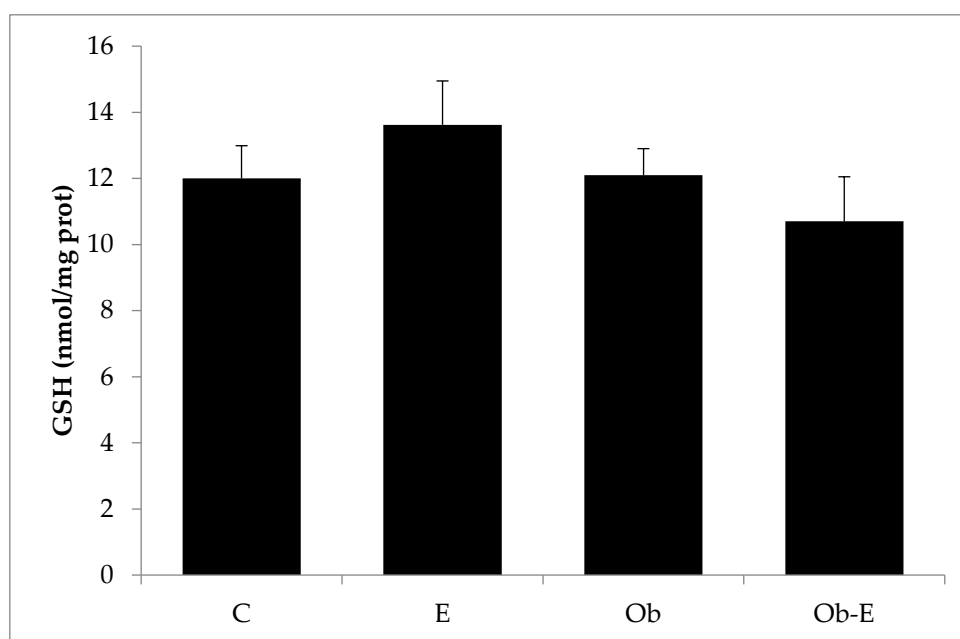
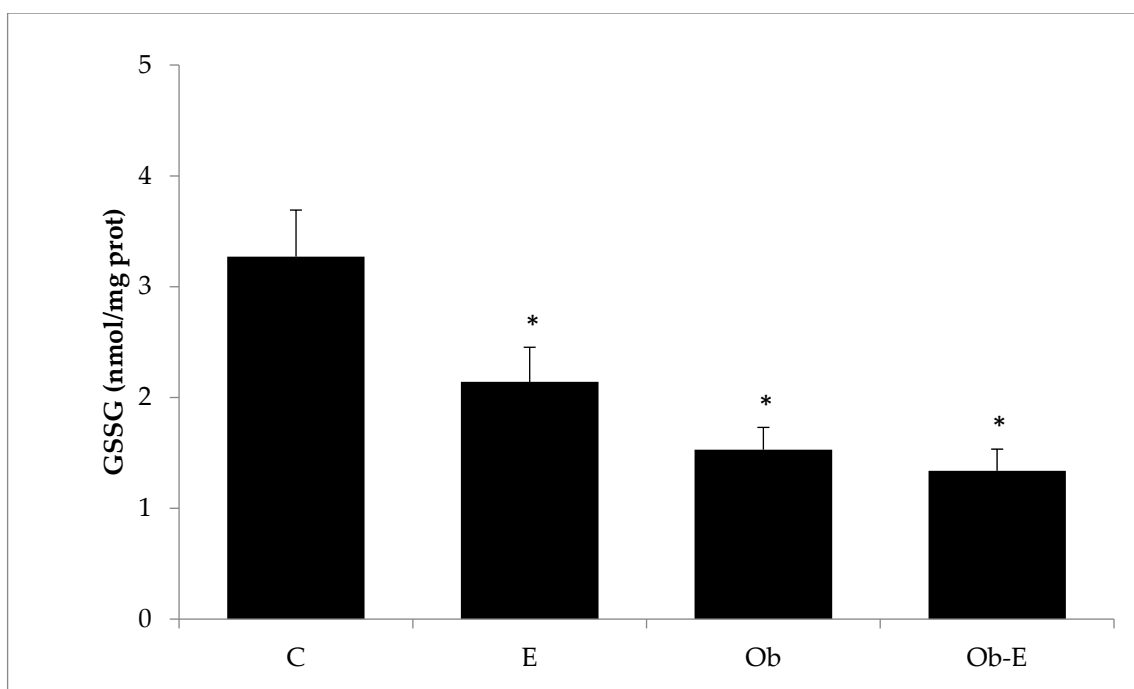


Figura 20. Concentraciones de GSH en homogenados de cerebro para los grupos C (control “wild-type”), E (“wild-type” alcohol etílico), Ob (Control Ob) y Ob-E (Ob alcohol etílico).

## i. EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA CONCENTRACIÓN DE GSSG

Del mismo modo que en el GSH, se analizaron las concentraciones de GSSG en los homogenados de cerebro de ratón. En este caso, el análisis estadístico ANOVA de una vía mostró diferencias significativas, para un nivel de significación del 95%, en la concentración de GSSG. Las comparaciones Post Hoc mostraron una concentración mayor del grupo C respecto del resto de los grupos de estudio (E, Ob y Ob-E) (Figura 21).



**Figura 21.** Concentraciones de GSSG en homogenados de cerebro para los grupos C (control “wild-type”), E (“wild-type” alcohol etílico), Ob (Control Ob) y Ob-E (Ob alcohol etílico) (\* $p < 0.05$  vs C).

## j. EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA RELACIÓN GSH/GSSG

Tras obtener los valores de concentración de GSH y GSSG se estudió la relación entre ellos para los distintos grupos de estudio. Así, tal y como se observa en la Figura 22, los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos. En este caso, las comparaciones Post Hoc mostraron una diferencia significativa del grupo Ob respecto al grupo C y del grupo Ob-E respecto a los grupos C y E, ambas diferencias con una significación del 95%.

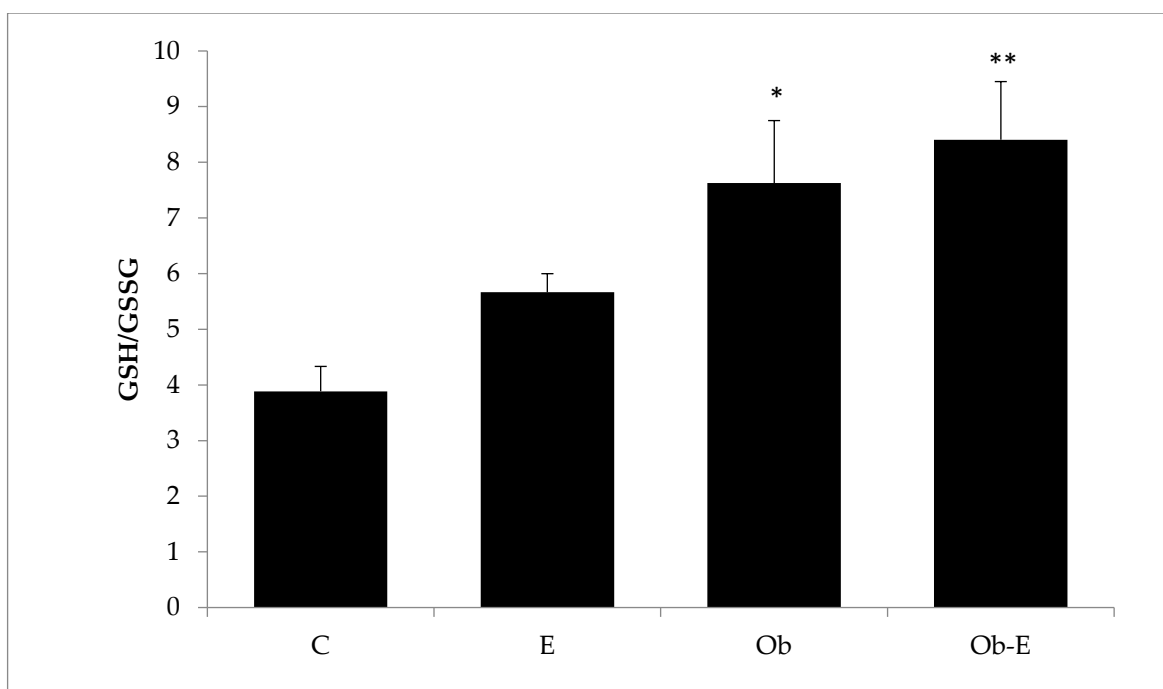
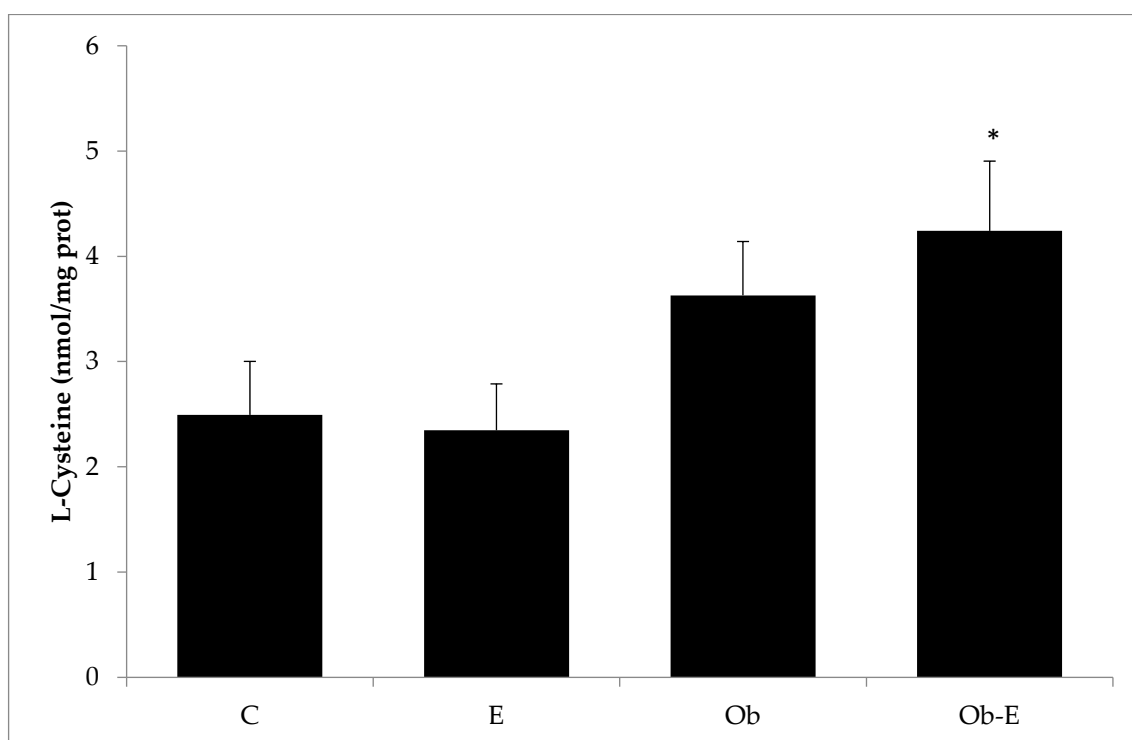


Figura 22. Relación GSH/GSSG (\*  $p < 0.05$  vs. C, \*\*  $p < 0.05$  vs. C y E).

## k. EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA CONCENTRACIÓN DE L-CISTEÍNA

La Figura 23 muestra los valores de concentración de L-Cisteína en homogenados de cerebro para los cuatro grupos de estudio (C, E, Ob y Ob-E). Las barras representan el valor medio  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico ANOVA y las comparaciones Post Hoc mostraron diferencias significativas al 95% de significación para el grupo Ob-E, respecto a los grupos C y E.



**Figura 23.** Concentraciones de L-Cisteína en homogenados de cerebro para los grupos C (control “wild-type”), E (“wild-type” alcohol etílico), Ob (Control Ob) y Ob-E (Ob alcohol etílico) (\* $p < 0.05$  vs C y E).

## 1. EFECTOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA CONCENTRACIÓN DE MDA

Para evaluar la destrucción celular y el daño oxidativo a las macromoléculas que forman la membrana celular, se utilizó el MDA como marcador de la peroxidación lipídica. En la Figura 24 se representa la media de concentración de MDA  $\pm$  desviación estándar para cada uno de los cuatro grupos de estudio (C, E, Ob y Ob-E). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA, que no mostró diferencias significativas en las concentraciones de MDA.

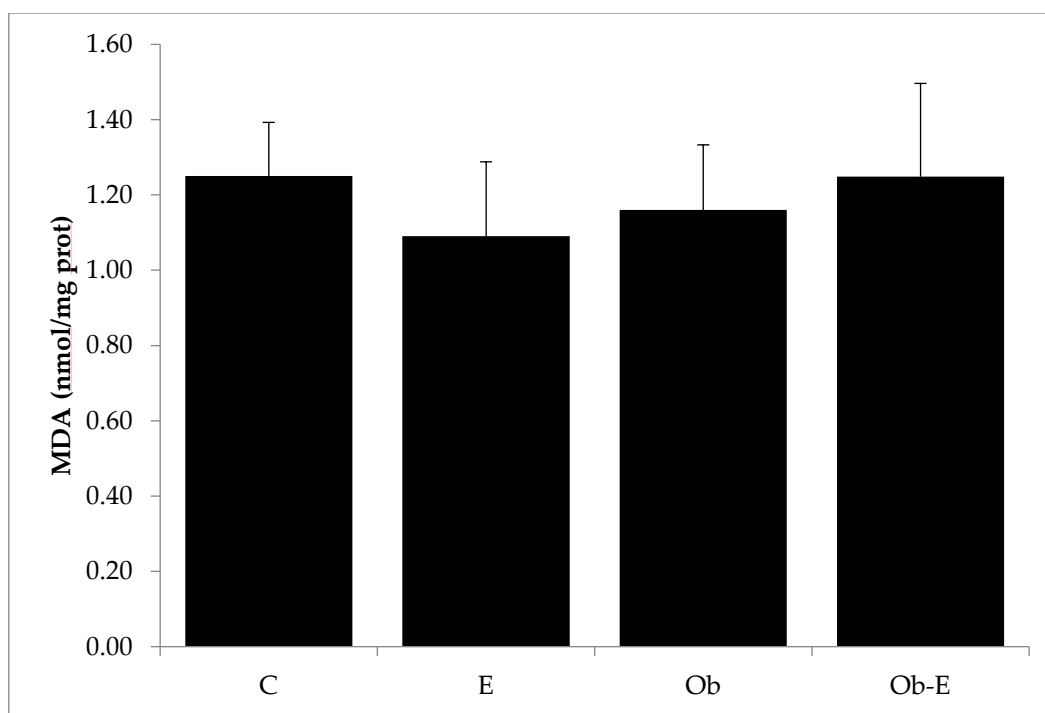


Figura 24. Niveles de MDA en los homogenados de cerebro.







## **DISCUSIÓN**



Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral muestran que el consumo crónico de alcohol normaliza los niveles de glucemia basal en los ratones *ob/ob*. Sin embargo, no se observan mejoras en la respuesta glucémica en el modelo ratón de MetS.

Cabe destacar que el consumo de alcohol etílico no afecta al peso ni a los niveles de insulina en sangre de los ratones E y Ob-E en comparación con sus respectivos controles, aunque sí se observan diferencias significativas entre los grupos Ob (grupos Ob y Ob-E) y “wild-type” (grupos C y E). Además, también se observó un aumento de la actividad antioxidante en el cerebro de los ratones (Ob-E) como mecanismo compensatorio a la agresión oxidativa producida por el consumo crónico de alcohol etílico, tal y como muestran los resultados de la actividad GR, la relación GSH/GSSG y los niveles de L-Cisteína.

## a. CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL ETÍLICO EN EL MODELO DE RATÓN OB

### i. Método de intoxicación

En este estudio se utilizaron ratones BL6.V-Lep<sup>*ob/ob*</sup>JRj, un modelo también conocido como “*ob/ob*”. Uno de los parámetros condicionantes de este experimento, es que los animales alcancen niveles de alcohol en sangre farmacológicamente relevantes. Para conseguir esto, en la literatura se han descrito diferentes procedimientos. Es importante remarcar que concentraciones superiores a 100 mg/dL de alcohol etílico en sangre son suficientes para producir efectos por intoxicación etílica en ratones. Esta concentración podría considerarse equivalente al criterio de 80 mg/dL en humanos, debido al elevado ratio metabólico de los ratones [245]. A este respecto, de entre los protocolos descritos para alcanzar dichas concentraciones de alcohol etílico en sangre, cabría destacar el uso de vapores de alcohol etílico, el uso de sondas gástricas, inyecciones intraperitoneales de

alcohol etílico de manera crónica, la utilización de dietas con alto contenido alcohólico, el protocolo *Drinking in the Dark* (DID), y la ingesta forzada de alcohol etílico en la bebida regular “*ad libitum*” [245], [246].

El uso de vapores de alcohol etílico es un sistema sencillo de administración, ya que solo necesita que el ratón inhale los vapores de alcohol etílico durante un tiempo concreto [247]. Como ventaja, es un procedimiento poco invasivo, que no requiere entrenamiento ni habituación por parte de los animales y es fácil de controlar para el investigador, que tan solo debe controlar la dosis y el tiempo de exposición [248]. Por contra, los vapores pueden irritar el tracto respiratorio del ratón, causando molestias al roedor. Además, los niveles de alcohol etílico en sangre descienden rápidamente tras el fin del ciclo de vapores. Esta técnica requiere de una cierta sofisticación instrumental para administrar los vapores en la dosis correcta, y de unas pruebas previas para evitar no administrar dosis extremadamente altas a los roedores [248], [249].

Por otro lado, el uso de sondas gástricas tiene como ventajas que se evita la aversión al gusto del alcohol etílico por parte de los ratones; se puede controlar exactamente la cantidad administrada a cada ratón y se consiguen niveles de intoxicación etílica muy altos [245]; aunque tiene la desventaja que es un procedimiento invasivo y muy traumático para el animal, que puede producir irritaciones graves al tracto intestinal y que, además, requiere de inmovilización para evitar que el ratón se quite la sonda. Debido a estos inconvenientes, el uso de sondas gástricas es indicado para experimentos con intoxicaciones agudas de alcohol etílico, pero no para experimentos crónicos como el que se plantea en esta tesis. Caso similar ocurre con las inyecciones de alcohol etílico [250], [251], ya sean intraperitoneales o subcutáneas, ya que requieren de manejo de los animales para inyectarles, además de causar irritaciones subcutáneas, siendo esto estresante para los animales.

En cuanto al uso de dietas con alto contenido alcohólico, como las dietas Lieber-DeCarli, tienen como ventaja la facilidad de su preparación y la sencillez de su procedimiento, además de que se han usado de forma extensa en la literatura. Por otro lado, se ha descrito que estas dietas pueden inducir la aparición de enfermedades hepáticas [252]. Es importante remarcar que, con el consumo de estas dietas, la ingesta se produce principalmente durante las primeras horas del ciclo oscuro con lo que los efectos causados por la intoxicación etílica en los valores de glucemia podrían desaparecer durante la fase de luz del ciclo lumínico [252].

El protocolo DID típico, consiste en sustituir la botella de agua de la caja en la que esta estabulado el ratón por una botella de una disolución alcohólica a partir de la tercera hora del ciclo de oscuridad y, mantenerla allí de dos a cuatro horas [246]. Este procedimiento utiliza el instinto natural del roedor de investigación y de alimentarse durante el ciclo oscuro para conseguir niveles de intoxicación etílica elevados. Como ventaja, este método no necesita de entrenamiento previo del ratón, ya que actúa de forma natural, ni el uso de edulcorantes para disimular el gusto del alcohol etílico. Además, es un método sencillo, que permite medir con una botella graduada el volumen de líquido ingerido por el animal. Volumen, que es ingerido de manera voluntaria, por lo que elimina el factor estresante de otros métodos comentados anteriormente. Por este motivo, se trata de un método muy usado para medir la voluntad del animal en consumir alcohol etílico, siendo un modelo aproximado de consumo alcohólico en humanos [245], [246]. Sin embargo, los niveles de alcohol etílico en sangre caen abruptamente durante la fase de luz del ciclo lumínico, con lo que podrían desaparecer los efectos del alcohol etílico sobre los niveles de glucemia y del estrés oxidativo.

En el presente estudio, se ha usado el procedimiento de administración forzada de alcohol etílico en el agua de bebida que, en estudios previos de este grupo, había mostrado ser

efectivo a la hora de alcanzar concentraciones de alcohol etílico en sangre farmacológicamente relevantes [153], [253]. Los ratones tienen la necesidad de mantenerse hidratados de manera natural, por lo que los niveles de alcohol etílico en sangre serán más o menos constantes a lo largo del experimento, sin grandes diferencias entre la fase lumínica y oscura. Además, se trata de un procedimiento de administración sencillo, puesto que solo necesita tener la bebida disponible en la jaula del animal y un pequeño entrenamiento previo para acostumbrar al animal al gusto. En nuestro caso, para evitar la aversión al gusto, se usaron además unas pocas gotas de edulcorante en la solución de alcohol etílico, que también fueron puestas en el agua de bebida de los ratones control para minimizar diferencias de consumo de líquido entre los distintos grupos. De esta manera, en el momento del sacrificio, se registraron niveles de alcohol etílico de  $108,5 \pm 18$  mg/dL y  $95,6 \pm 22,6$  mg/dL para los grupos E y Ob-E.

Hay que destacar que existe una dificultad a la hora de comparar resultados entre distintos experimentos. Por un lado, es difícil determinar la cantidad de alcohol etílico que ha ingerido efectivamente un animal para poder comparar entre los distintos estudios. A este respecto, suele utilizarse la ingesta de alcohol etílico en g/kg, aunque no es una medida muy precisa, ya que parte del alcohol etílico podría haberse evaporado o incluso haber sido derramado accidentalmente durante el proceso de ingesta por los ratones. Para salvar esta limitación y poder tener resultados más exactos sobre el nivel de intoxicación de los ratones, es necesario medir el contenido alcohólico en sangre. Además, como dificultad añadida para comparar entre distintos estudios, está el uso de distintas unidades para medir el contenido alcohólico en sangre, como son las unidades milimolar (mM), miligramos por decilitro (mg/dL), porcentajes (%) o gramos por kilogramos (g/Kg).

En resumen, este estudio se utilizaron ratones *ob/ob* con un procedimiento de ingesta forzada de alcohol etílico en el agua de bebida para conseguir niveles de alcohol etílico



en sangre farmacológicamente relevantes. Este procedimiento presenta ventajas como que es un procedimiento compatible con la etología del animal y sencillo de implementar. Sin embargo, presenta la desventaja de la posible aversión al gusto del alcohol etílico, por lo que requiere un periodo de adaptación por parte de los roedores.

## ii. Pesos ratones

Respecto al peso de los animales, es importante remarcar que la correcta monitorización de este parámetro es crítica ya que los ratones mutantes deberían presentar un fenotipo obeso. Por otro lado, puesto que los valores glucémicos son determinantes en el presente trabajo, las diferencias observadas deberían ser consecuencia del efecto derivado de la ingesta de alcohol etílico y no una consecuencia de la modificación genética del modelo.

En cuanto al comportamiento metabólico esperado respecto al modelo animal, los ratones presentaban un fenotipo obeso como consecuencia de la hiperfagia, causada por la falta de leptina funcional [220]. La acción de la hormona leptina en los receptores del hipotálamo controla el consumo de energía en el cuerpo, el ratio metabólico y el apetito. Por este motivo, tal y como se describe en la literatura [222], el fenotipo obeso de los ratones *ob/ob* es apreciable a las pocas semanas de edad. Como puede apreciarse en la Figura 13, donde se muestran los pesos de los ratones a lo largo del experimento, el peso de los ratones Ob era superior respecto al de los ratones “wild-type” a lo largo del experimento. Se podría argumentar que la falta de leptina también afecta los niveles de glucemia basal, ya que la leptina también actúa como regulador del metabolismo de la glucosa, por lo que los ratones *ob/ob* presentan niveles de glucemia en sangre elevados. Sin embargo, tal y como se detalló en el marco teórico, el metabolismo de ácidos grasos, la glicólisis y la gluconeogénesis de los ratones *ob/ob* es similar a la de otros modelos experimentales de obesidad inducida por dieta [226].

Respecto al peso de los animales, no se observaron diferencias significativas de peso entre el grupo de estudio (Ob-E) y su grupo control (Ob). El consumo abusivo de alcohol etílico ha sido relacionado con mayor malnutrición, tanto por un mayor consumo de dietas poco equilibradas en consumidores abusivos de alcohol etílico, en las que se produce una sustitución de macronutrientes como los carbohidratos y las proteínas por consumo de alcohol etílico [254]; como por el efecto que tiene este alcohol sobre la absorción de los nutrientes en dietas más o menos equilibradas [255]. Además, el consumo crónico de alcohol etílico aumenta la lipólisis en los adipocitos, reduciendo el tamaño del tejido adiposo en ratones [256].

Por estos motivos, podría resultar esperable que los pesos de los ratones de los grupos E y Ob-E fuesen inferiores a los de sus respectivos grupos control (C y Ob). Por ejemplo, en un estudio usando un modelo de roedor (ratas Long Evans), Tong y cols observaron una reducción del peso de las ratas asociada al consumo de alcohol etílico, aunque en este caso, usaron como método de administración de alcohol etílico una dieta Lieber-DeCarli con un 37% de contenido alcohólico [257]. Estos autores también observaron que este efecto era más acusado en ratas hembra que en macho, lo que además demostraría que los efectos del metabolismo del alcohol etílico afectan de manera distinta según el sexo. Esto se ha descrito también en un modelo epidemiológico en humanos, tal y como se observó en la tercera encuesta nacional de salud y nutrición en Estados Unidos [254].

A pesar de que algunos autores han encontrado efectos de este tipo de dietas alcohólicas en el peso de los animales, no siempre ocurre de esta manera. Rasineni y colaboradores no encontraron diferencias en el peso en experimentos con modelo de roedor (ratas wistar) alimentadas con una dieta Lieber-DeCarli al 36% de alcohol etílico frente al grupo control que sustituía el alcohol etílico por maltodextrina para mantener las dos dietas isocalóricas [258]. Aunque los investigadores no encontraron diferencias en el peso total de las ratas

entre los distintos grupos de estudio, sí que observaron una disminución en el tejido adiposo en las ratas que consumían la dieta con alcohol etílico y un aumento equivalente en el peso del hígado de dichas ratas.

En resumen, en el presente trabajo, no se observaron diferencias significativas entre el peso de los ratones con alcohol etílico (E y Ob-E) frente a sus respectivos controles (C y Ob), aunque sí que se observó una diferencia en el peso entre los ratones “wild-type” y los ratones mutantes *ob/ob* causada por la deficiencia de leptina. Sin embargo, la falta de leptina no afecta al metabolismo de ácidos grasos, la glicólisis y la gluconeogénesis en los ratones *ob/ob* cuando se compara con otros modelos experimentales de obesidad [226].

### iii. Niveles de glucemia, insulinemia y sensibilidad a la insulina

Con el objeto de determinar si el consumo de alcohol etílico afecta a la secreción de insulina, se determinó su concentración en sangre. Así mismo, puesto que los valores glucémicos son determinantes en el presente trabajo, resulta importante determinar si existe una relación entre la variación de los niveles de insulina y los niveles de glucemia basal.

Respecto a los niveles de insulina, se observó que los valores obtenidos en el momento del sacrificio en los grupos mutantes (Ob y Ob-E) fueron significativamente superiores a los valores de los grupos control (C y E) (Figura 15). Esto coincide con lo descrito en la literatura para este modelo experimental ya que presenta hiperinsulinemia debido a un aumento de la secreción de insulina en las células beta [63], [214], [216], [218], [223]. Cuando las glucoquinasas detectan un aumento de la concentración de glucosa, la transportan hacia el interior de las células beta promoviendo la entrada de piruvato en la mitocondria y produciendo ATP, que modifica el ratio ATP/ADP. Este aumento del ratio ATP/ADP activa los canales de  $Ca^{2+}$  a la vez que bloquea el canal de  $K^+$  ATP, estimulando

la secreción de insulina. Cuando la secreción de insulina no es suficiente para mantener la homeostasis de la glucosa en sangre, se produce transdiferenciación de células  $\alpha$  a células  $\beta$  y aumento del tamaño de los islotes de Langerhans para compensar la resistencia a la insulina en el MetS [113]. En un estudio piloto realizado en nuestro laboratorio, se observó el anteriormente descrito aumento del tamaño de los islotes de Langerhans que contienen las células  $\beta$  encargadas de la secreción de insulina. Para ello, se usó un procedimiento en el que se inyectaba colagenasa por el colédoco para digerir el páncreas exocrino y preservar la ultraestructura de los islotes de Langerhans que posteriormente se analizaron al microscopio para procesar las imágenes con el software Image J [259]. Durante el procedimiento de extracción, al comparar la cantidad y tamaño de islotes observados entre los ratones “wild-type” y mutantes, se observó un mayor número de islotes de gran tamaño en los ratones obesos en comparación con los islotes extraídos de los ratones “wild-type”. Lamentablemente, estos datos estaban siendo procesados por el Catedrático D. Juan Vicente Sánchez-Andrés (D.E.P.) en el momento de su fallecimiento, y no ha sido posible acceder a su ordenador para recuperar los datos e incluirlos en esta tesis doctoral permitiéndonos demostrar dicha hipótesis en nuestro trabajo.

Por otro lado, en nuestro modelo experimental, no se observaron diferencias significativas de los niveles de insulina entre el grupo alcohol étílico y el grupo control (C vs E y Ob vs Ob-E). Este hecho podría significar que el consumo de alcohol étílico no afecta a la secreción de insulina o, al menos, a los niveles de insulina en sangre tras 6 semanas de consumo. La literatura disponible hasta el momento no deja claro si el consumo de alcohol étílico favorece o no la secreción de insulina, ya que hay evidencia científica que apoya tanto que el alcohol étílico disminuye la secreción de insulina [186], [258], [260] como que aumenta la secreción de insulina [186], [201]. En la revisión de Steiner, Crowel y Lang, atribuyen las discrepancias entre los distintos resultados al uso de distintas especies

animales, distintas concentraciones de alcohol etílico y distintos métodos de intoxicación etílica, así como al método de ensayo empleado (*in vitro* vs *in vivo*) [186]. Sin embargo, tal y como puede verse en la Figura 14, los ratones del grupo Ob mostraron unos niveles de glucemia elevados a lo largo del experimento tal y como se esperaba, mientras que los ratones Ob-E, redujeron los valores de glucemia basal a partir de la segunda semana consumiendo alcohol etílico, llegando a ser significativa la diferencia de glucemia entre el grupo Ob y el resto de grupos, a pesar de mantener elevados los niveles de insulina en sangre.

Estos resultados son interesantes si se tiene en cuenta que, tal como se ha comentado en el apartado anterior y tomando en consideración los resultados mostrados en la Figura 15, los niveles de insulina entre el grupo Ob-E y su control son similares. Por tanto, la reducción de la glucosa basal observada en los ratones Ob-E podría deberse a una mayor sensibilidad a la insulina. Esta hipótesis parece ser respaldada por la literatura existente, ya que existen muchos estudios que apuntan a que el consumo moderado de alcohol etílico aumenta la sensibilidad a la insulina. Estos estudios muestran una relación en forma de U entre el consumo de alcohol etílico y la sensibilidad a la insulina [184], [185], [187], [188], [189], [190], [191], [208]. La correlación entre el consumo de alcohol etílico y la sensibilidad a la insulina podría ser explicada por un aumento de la secreción de insulina causada por el consumo de alcohol etílico a través de la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  [201]; por una interferencia del alcohol etílico con los mecanismos de señalización de la insulina, como la señalización PI3K/Akt y la traslocación del GLUT4; o bien por efectos del alcohol etílico en la regulación y expresión de la glucoquinasa (GCK) [112].

Otros autores apuntan a la posibilidad de que la disminución observada de la glucemia basal no es debida a un aumento de la sensibilidad a la insulina propiamente, sino a una disminución de la gluconeogénesis en el hígado producida por el alcohol etílico [261].

Cuando esto sucede, la producción hepática de glucosa es sostenida por la glucogenólisis hasta que se agotan las reservas de glucógeno en el hígado, produciéndose hipoglucemia debido al consumo del alcohol etílico [262]. El contenido de glicerol en el hígado y los niveles de FFA en plasma también se ha descrito que se ven disminuidos por acción del alcohol etílico [186], [193], por lo que contribuyen más si cabe a la inhibición de la glucogenólisis. Además, la glucogenólisis también se ve reducida por acción del alcohol etílico, debido a que el metabolismo de éste (por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa) modifica la ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , reduciendo la cantidad de piruvato y, por tanto, reduciendo la piruvato-carboxilasa, que es la enzima limitante del proceso de glucogenólisis. Estos procesos, en su conjunto, reducen finalmente la cantidad de glucosa producida por el hígado [192]. Nuestros datos parecen apoyar esta segunda hipótesis al no haberse observado un aumento de la secreción de insulina en nuestro modelo experimental, aunque serían necesarios nuevos experimentos para poder confirmar la causa real de esta reducción de la glucemia causada por el consumo de alcohol etílico. Además, los niveles de glucemia basal del grupo E también se redujeron respecto a su grupo control, aunque no de manera estadísticamente significativa. Aun así, tomando esta tendencia en consideración junto con los datos de los ratones Ob-E, se podría plantear la existencia de un efecto del alcohol etílico sobre el estado glucémico de los ratones.

Para intentar determinar si el consumo crónico de alcohol etílico produce una mejora en la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, se realizó un test de sobrecarga de glucosa. Respecto a los resultados del este test (Figura 16), se observan diferencias significativas entre el grupo MetS (Ob y Ob-E) frente al grupo “wild-type” (C y E). El MetS se caracteriza por resistencia a la insulina y un estado glucémico alterado (estado prediabético), que en ocasiones avanza hasta la aparición de la T2D.

La T2D está caracterizada por hiperglucemia en estado basal, cuya aparición viene precedida por una pérdida gradual del control glucémico después de las comidas [263]. Por este motivo no es extraño observar unos niveles de glucemia más elevados durante el test en los grupos MetS. Sin embargo, es llamativa la diferencia entre el grupo Ob-E y su respectivo grupo control (Ob). Estos resultados parecen indicar que el consumo de alcohol etílico empeora el estado glucémico postprandial en los ratones Ob-E sin empeorar los niveles de glucemia basal (Figuras 16 y 14, respectivamente). Estos datos apoyan la idea de que el alcohol etílico genera un efecto en la homeostasis glucémica celular dependiente del tiempo, posiblemente debida al agotamiento de las reservas de glucógeno en el hígado y no a un efecto sensibilizante a la insulina, ya que, de ser así, los datos glucémicos de los ratones Ob-E tras la sobrecarga deberían mejorar respecto a los ratones Ob o tardar menos tiempo en recuperar valores de glucemia.

Los resultados del test de sobrecarga de glucosa entrarían en contradicción con las conclusiones de distintos estudios publicados anteriormente [264], [265], [266]. Estos trabajos, realizados en humanos, se basan en datos recogidos en encuestas y relacionados con los datos de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) de los participantes, hallaron una disminución de la hemoglobina glicosilada en bebedores moderados. Además, en el estudio de Gulliford y Ukoumunne [264] se estableció también una relación entre el consumo de cigarrillos o de alimentos con alto contenido en grasa con un aumento de la HbA<sub>1c</sub>. Otro estudio de Harding y colaboradores [265], llegó incluso a establecer relaciones de reducción de hemoglobina glicosilada por cada unidad de alcohol etílico consumida semanalmente. En este estudio también se encontró una relación entre la reducción en la cantidad de HbA<sub>1c</sub> y el tipo de bebida alcohólica consumida, manteniendo abierta la incógnita de si es el alcohol etílico mismo el que produce esta reducción o, por

contra, está relacionado con otras propiedades de las bebidas alcohólicas empleadas, como los antioxidantes o el tipo de bebida.

En resumen, el consumo de alcohol etílico no modifica la secreción de insulina en nuestro modelo de experimentación, aunque sí modifica los niveles de glucemia de los grupos E (Ob-E y E) frente a sus controles. Este fenómeno puede explicarse por un aumento de la sensibilidad a la insulina o bien por una disminución de la gluconeogénesis en el hígado. Aunque nuestros datos parecen apuntar a esta segunda hipótesis, son necesarios nuevos experimentos que ayuden a elucidar la causa subyacente a la reducción de la glucemia causada por el consumo de alcohol etílico.

Por otro lado, el test de sobrecarga de glucosa muestra diferencias significativas entre los grupos MetS (Ob y Ob-E) frente a los grupos “wild-type” (C y E). También se observan diferencias entre los grupos Ob y Ob-E que como hemos dicho, pueden explicarse por el efecto del alcohol etílico sobre la gluconeogénesis en el hígado.

#### iv. Mortalidad y datos preliminares estudio largo plazo

A lo largo del experimento el grupo Ob sufrió la muerte del 30% de los animales debido a shocks glucémicos causados por el desarrollo de T2D. En cambio, en el grupo Ob-E, aunque los ratones presentaban valores elevados de glucemia, ningún ratón sufrió shock glucémico y muerte. A este respecto, no se ha encontrado en la literatura ningún estudio describiendo este fenómeno. Sin embargo, esta diferencia en la mortalidad podría explicarse por la disminución de la gluconeogénesis y la glucogenólisis en el hígado en los ratones Ob-E debido al consumo de alcohol etílico. Al disminuir los niveles de glucosa en sangre, aunque elevados, no causan shock hiperglucémico en los ratones Ob-E y, por tanto, disminuye su mortalidad. Este efecto no se observa en los Ob, grupo que no consume alcohol etílico. Datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la administración de alcohol etílico a un modelo animal de MetS durante 6 meses



agrava la respuesta a una sobrecarga de glucemia y reduce la secreción de insulina en los ratones Ob-E. Por este motivo son necesarios más estudios para determinar la manera en la que el alcohol etílico influye en el estado glucémico de los animales, así como el efecto de la dosis administrada y si la reducción en la secreción de insulina se debe a apoptosis de las células  $\beta$ , fallo en su función o por sobrecarga.

#### v. Resumen

En este primer punto de la discusión se ha intentado discutir los efectos del consumo crónico de alcohol etílico en el modelo de experimentación usado en este estudio. El modelo animal usado ha sido un modelo de roedor BL6.V-Lep<sup>ob/ob</sup>JRj, un modelo también conocido como “ob/ob”. Este modelo roedor, fue sometido a un procedimiento de ingesta forzada de alcohol etílico a través de la bebida “*ad libitum*”, alcanzando niveles de alcohol etílico en sangre de  $108,5 \pm 18$  mg/dL y  $95,6 \pm 22,6$  mg/dL para los grupos con alcohol etílico (E y Ob-E) en el momento del sacrificio. Este modelo ratón, tiene un peso elevado debido al déficit de leptina, siendo el peso de los grupos mutantes (Ob y Ob-E) estadísticamente significativo respecto a los grupos “wild-type” (C y E). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas de peso entre los grupos alcohol (E y Ob-E) y sus respectivos controles (C y Ob), por lo que el alcohol etílico no produce reducción en el peso de los ratones.

En cuanto a los valores de insulina en el momento del sacrificio, se observaron diferencias significativas entre los grupos “wild-type” (C y E) y los grupos obesos (Ob y Ob-E), aunque no se observaron diferencias entre los grupos con alcohol etílico y sus respectivos controles. Estos resultados, unidos al hecho que se observó una disminución de los niveles de glucemia basal en los ratones Ob-E a lo largo del experimento, podrían indicar un efecto de sensibilización a la insulina por efecto del alcohol etílico. Otra explicación posible podría ser la reducción de la gluconeogénesis por acción del alcohol etílico, tal

como señalan los datos de sobrecarga oral de glucosa, en que parece que el consumo de alcohol etílico produce un empeoramiento del estado glucémico postprandial en ratones sin que eso empeore los niveles de glucemia basal. A la vista de estos resultados, son necesarios nuevos experimentos que ayuden a determinar la causa de la reducción de la glucosa causada por el consumo de alcohol etílico.

## b. EFECTOS COGNITIVOS DEL CONSUMO DE ALCOHOL ETÍLICO EN RATONES OB

Una de las cuestiones que subyacen a este estudio es como afecta el consumo crónico de alcohol etílico a las funciones cognitivas del SNC. Los efectos cognitivos del consumo de alcohol etílico han sido ampliamente estudiados en la literatura. El consumo de alcohol etílico produce un aumento del estrés oxidativo del cerebro, debido a que produce cambios en las membranas celulares, causando cambios en la actividad neuronal, modulación de neurotransmisores, incrementa la pérdida neuronal, y la neurodegeneración [128]. Además, también afecta a las funciones ejecutivas del cerebro, provocando desinhibición, fallos en el razonamiento, en la actividad motora, el cálculo, y amnesia temporal, así como daños en la memoria a largo plazo [146], [147], [148], [149], [150].

Por otro lado, el desarrollo de patologías como la resistencia a la insulina, el sobrepeso, hipertensión o el MetS han sido relacionados con el estado inflamatorio y autofágico del hipotálamo debido a las citoquinas IKK- $\beta$ , NF- $\kappa\beta$  [122], [123]. Así mismo, estas patologías también se han relacionado con degeneración neuronal y desajustes cognitivos en roedores [125], [126], así como con neuroinflamación y neurodegeneración causada por daños a la función y supervivencia de oligodendritos, afectando a la memoria y el aprendizaje [128].

Por estos motivos, es importante estudiar los efectos cognitivos causados por ambas patologías, para determinar si se produce alguna diferencia en el desempeño cognitivo de nuestro modelo animal debido al consumo crónico de alcohol etílico en combinación con el MetS.

Para evaluar los efectos cognitivos causados por el consumo crónico de alcohol etílico en nuestro modelo experimental, se realizó el *Novel Object Recognition Test*, mediante el cual se establecen relaciones de memoria a partir del tiempo que los ratones pasan explorando los distintos objetos de su entorno. El *Novel Object Recognition Test* se basa en la tendencia natural de los ratones a explorar los objetos del entorno que les rodea y, como no incluye ningún estímulo externo que condicione los resultados, tales como descargas eléctricas o comida; sirve como test de los procesos cognitivos de los ratones.

Entre los procesos cognitivos que pueden ser evaluados con esta prueba se encuentra la memoria, ya que pueden establecerse relaciones de memoria según el tiempo que los ratones pasan explorando los objetos, debido a la preferencia por explorar objetos nuevos o desconocidos por parte de los animales. Como puede apreciarse en las Figura 17, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio para el corto plazo (Figura 17.a), ni para el largo plazo (Figura 17.b); por lo que se puede inferir que el consumo crónico de alcohol etílico no afecta a los procesos de memoria a corto y largo plazo en nuestro modelo ratón de MetS y con los tests utilizados en este trabajo.

Hay que señalar que diferentes autores sí hallaron un deterioro cognitivo en la memoria debido al consumo de alcohol etílico en consumos durante cortos periodos de tiempo. Por ejemplo, Pascual y colaboradores, usaron ratones C57BL6 a los que intoxicaron con alcohol etílico al 10 % en el agua de bebida durante cinco meses en un procedimiento similar al planteado en esta tesis [153], [267]. En estos estudios, para concentraciones de alcohol etílico en sangre de 110 mg/mL observaron diferencias en el *Novel Object Recognition Test* entre los grupos “wild-type” control y “wild-type” alcohol etílico. No hallando diferencia en los grupos de ratones mutantes usados en su estudio, pero sí un aumento de citoquinas proinflamatorias en el cerebro, que podrían apuntar a daño cerebral causado por el consumo crónico de alcohol etílico. Por su parte, Beaudet no encontró

diferencias significativas en ratones C57BL6 adultos a los que se les había administrado intraperitonealmente 2g/Kg de alcohol etílico durante 15 días frente a sus controles adultos en su desempeño en distintos test conductuales como el *Novel Object Recognition Test*, *light-dark box* y el *elevated plus-maze*. En cambio, al comparar estos ratones frente a ratones adolescentes a los que se les había aplicado el mismo tratamiento, y a ratones adultos que habían recibido el mismo tratamiento en la adolescencia; observaron un peor desempeño en los test por parte de estos grupos de ratones, frente a los adultos con el tratamiento en la adultez, demostrando que el abuso de alcohol etílico en la adolescencia afecta severamente a las funciones cerebrales [251]. Por su parte, Johnsen-Soriano y cols, observaron una peor latencia en un modelo animal de roedor (ratas Sprague-Dawley) alimentadas 20 días con dieta Lieber-DeCarli con un contenido de alcohol etílico del 6.4% en el test del laberinto de agua de Morris frente a los grupos control, estableciendo así un daño cognitivo debido al alcohol etílico [268]. En otro estudio, el grupo de investigación de King y cols observó afectación de la memoria espacial en ratones C57BL6 hembra de 12 semanas de edad a las que se les había administrado una dieta Lieber-DeCarli con un 5% de alcohol etílico durante 10 días [269]. En este caso, para determinar el daño cognitivo utilizaron una variante del *Novel Object Recognition Test* en la que usaban cuatro objetos que, algunos eran sustituidos por objetos nuevos y otros simplemente cambiaban su posición en el espacio, para así tratar de determinar si también se veía afectada la memoria espacial. En este caso, cabe tener en cuenta que existe un dimorfismo sexual en el metabolismo del alcohol etílico y, por tanto, los resultados del *Novel Object Recognition Test* no tienen por qué coincidir entre machos y hembras para la misma cantidad de alcohol etílico. En este sentido, Paiva-Santos y sus colaboradores estudiaron el efecto combinado de las hormonas sexuales y el alcohol etílico en el *Novel Object Recognition Test* en un modelo roedor (ratas Wistar) con tratamiento intraperitoneal de

alcohol etílico 0,6 g/Kg y 1,8 g/Kg [250]. En estos estudios, observaron una mayor preferencia por los objetos nuevos en los ratones macho en el corto plazo, mientras que las hembras y los ratones macho con dosis de alcohol etílico elevadas no mostraron preferencia por los objetos nuevos. En cuanto al largo plazo, eran las hembras las que mostraban mayor preferencia y, aunque todos los machos mostraron también discriminación de objetos, los de mayor dosis de alcohol etílico mostraron una menor preferencia por los explorar los nuevos objetos. Estos resultados podrían estar influidos por el ciclo hormonal de las hembras, ya que los autores observaron que el rendimiento en proestro fue peor en comparación con otras fases del ciclo.

La diferencia con estos estudios puede deberse a las distintas condiciones experimentales usadas en estos experimentos para la intoxicación etílica: Lieber-DeCarli [268], [269] o inyecciones intraperitoneales [250], [251]; ya que el modelo de administración de alcohol etílico usado en nuestro experimento ha demostrado ser efectivo como método de intoxicación etílica, aunque puede que requiera de mayores periodos de tiempo para producir daños cognitivos y conductuales [153], [267]. Otra de las causas que podría explicar la diferencia en los resultados publicados podría ser la dosis alcohólica y el sexo de los animales, ya que los autores citados anteriormente hallaron daños cognitivos en función del sexo y la dosis alcohólica [250], donde los ratones macho con mayor dosis de alcohol etílico administrada intraperitonealmente mostraban daño cognitivo antes que sus homólogos con menor dosis o las hembras a igual dosis. Cabe destacar, que la divergencia en los resultados también podrían ser resultado del uso de ratas como modelo animal de experimentación en los citados estudios [250], [268], [269].

Otros factores que podrían afectar a la determinación del daño cognitivo son el uso de otros test complementarios como el *water maze* o el *elevated plus-maze*, aunque estos test están más encaminados a estudiar otros factores como la ansiedad. También el diseño del

experimento del *Novel Object Recognition Test* puede haber influido, ya que no es lo mismo un entrenamiento de cinco minutos que un entrenamiento más corto o largo, ya que los animales pueden explorar más detenidamente el entorno y los objetos; así como la forma y tamaño del campo de pruebas, ya que si es muy grande puede desincentivar a los animales a explorar o crearles ansiedad en caso de ser muy pequeño. Los objetos por explorar también son importantes, ya que teniendo en cuenta que los roedores tienen dificultades para diferenciar el color, es importante buscar figuras de forma distinta y sin olor, o al menos que su olor no ahuyente al animal. También resulta muy importante, la hora del ciclo de luz empleada para realizar el test, ya que los ratones están mucho más activos en las horas de la fase oscura. Otros aspectos que considerar son la ansiedad del animal al manejo por parte del experimentador y el uso de programas para analizar los videos, ya que puede que no recojan con exactitud todas las aproximaciones al objeto, que además pueden diferir entre softwares o estudios, dificultando la comparación entre estudios. En nuestro caso, estos parámetros ya fueron validados para nuestro modelo experimental por miembros del grupo de experimentación y ha mostrado ser efectivo en publicaciones previas [153], [267], por lo que la ausencia de diferencias debe atribuirse al corto tiempo de intoxicación etílica, a pesar de que los niveles de alcohol etílico en sangre son similares.

En resumen, se realizó el *Novel Object Recognition Test*, para establecer relaciones de memoria a partir del tiempo que los ratones pasan explorando los distintos objetos de su entorno. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio para el corto plazo ni para el largo plazo en nuestro modelo ratón de MetS. Aunque otros autores sí que hallaron deterioro cognitivo en la memoria atribuible al efecto del alcohol etílico, estas diferencias podrían ser efecto del diseño experimental, el uso de otros test

complementarios, la dosis de alcohol etílico, el sexo de los animales o el modelo animal elegido para el estudio.



### c. EFECTOS DEL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL ETÍLICO EN EL SISTEMA OXIDATIVO DEL CEREBRO DE LOS RATONES OB

El consumo crónico de alcohol etílico está relacionado con un aumento del estrés oxidativo en el cerebro [270]. Esta alteración del balance oxidativo del cerebro está inducida porque el alcohol etílico, al atravesar la barrera hematoencefálica es metabolizado a nivel central mediante la ruta de la catalasa [135], generando acetaldehído, una molécula altamente reactiva y tóxica; y ROS. Por su parte, el MetS se caracteriza, entre otros, por un estado de inflamación crónica que aumenta el estrés oxidativo del sistema debido a la sobrealimentación. Además, la hipertrigliceridemia, la hipertensión, hiperglucemia, la resistencia a la insulina y la obesidad, síntomas típicos del MetS, también aumentan la producción de ROS por un aporte excesivo de electrones a la cadena respiratoria, aumentando el estrés oxidativo celular. Por este motivo, dado que tanto el MetS como el consumo crónico de alcohol etílico están relacionados con un aumento del estrés oxidativo, resulta interesante estudiar el efecto que tiene el consumo crónico de alcohol etílico combinado con el MetS sobre el estado oxidativo del SNC de ratones.

Para eliminar las especies reactivas y restaurar la homeostasis redox, las células cuentan con sistemas antioxidantes como el sistema glutatión. De forma sencilla, el glutatión se encuentra en equilibrio entre su forma oxidada y reducida, pero su concentración total permanece constante. Cuando hay desequilibrio redox debido a la presencia de ROS, la enzima glutatión peroxidasa (GPx) reduce la especie reactiva que genera el desequilibrio al tiempo que oxida el glutatión de su forma reducida (GSH) a su forma oxidada (GSSG). Posteriormente, para reponer el sustrato para defenderse de futuras amenazas redox, el

glutación vuelve a su forma reducida mediante la enzima Glutación Reductasa (GR) [175], [271].

i. GSH, GSSG, GR y GPx

En nuestras condiciones experimentales, se observa un aumento en la actividad GR en el cerebro de los ratones Ob-E (Figura 18) y un aumento de la relación GSH/GSSG (Figura 22), debido a la menor cantidad de GSSG en el cerebro de todos los grupos respecto a los controles (C) (Figura 21), mientras que no se observa un aumento de la actividad GPx (Figura 19), ni una variación significativa de GSH (Figura 20).

Ante una agresión oxidativa, se esperaría que los niveles de GSH hubiesen disminuido al activarse el GPx para reducir las especies ROS en especies menos dañinas para las células, y que hubiese aumentado la cantidad de GSSG, manteniéndose la cantidad de glutación constante en el tiempo. Ante una agresión oxidativa, también podría suceder que los valores de GSH y GSSG (y por tanto su ratio), permanezcan más o menos constantes, tal y como observó Somnavilla y cols, quienes observaron un aumento de la actividad GPx, pero no una modificación de la cantidad de GSH, GSSG ni su ratio, en un experimento con ratas de distintas edades a las que se les administró alcohol etílico (1,5 g/Kg) a través de una sonda gástrica durante tres días. [272]. Aunque para que esto suceda, la actividad GPx debería ser compensada por la actividad GR y la formación de GSH *de novo*.

En nuestro caso se observa como la cantidad de GSH no se ve afectada, mientras que la cantidad de GSSG y la relación GSH/GSSG sí que se ven alteradas. Estos datos apuntan a la existencia de un mecanismo compensatorio después de una agresión oxidativa en la que las células aumentan de manera temporal la defensa antioxidante mediante la síntesis de GSH, la captación extracelular de GSH o la restitución del GSH a partir del GSSG mediante la acción de la GR [273] para hacer frente al desajuste redox hasta restablecer las condiciones homeostáticas.

Este aumento de la capacidad antioxidante ha sido descrito por diversos autores que mostraron un aumento de los niveles de GSH ante una agresión oxidativa. Así, por ejemplo, Satriano y sus colaboradores observaron un aumento de la concentración de GSH en sangre en niños sometidos a una intervención de bypass cardiopulmonar durante las 24h siguientes a la intervención quirúrgica [274]. Del mismo modo, Sanchez-Vallejo y sus colegas observaron un aumento de GSH en la retina de un modelo roedor de degeneración retinal (ratones C57BL6) tras la introducción de un agente inductor de estrés oxidativo [275], que fue acompañado de una reducción de la concentración del GSH cuando las células dejaron de tener capacidad de producir más GSH.

En resumen, ante una agresión oxidativa, las células activan el sistema glutatión para evitar daños por estrés oxidativo, lo que se conoce como defensa antioxidante. En nuestro estudio, no se observaron cambios en la cantidad de GSH, aunque sí se modificaron la cantidad de GSSG y la ratio GSH/GSSG. Además, la GR estaba alterada, mientras que no se observaron diferencias significativas en la GPx. Estos datos apuntan a la existencia de un mecanismo compensatorio para hacer frente al desajuste redox hasta restablecer las condiciones homeostáticas. Este fenómeno ha sido observado por otros autores de la literatura.

## ii. L-Cisteína

En nuestro estudio, se observa un aumento de la concentración de L-Cisteína en los ratones Ob-E frente a los ratones “wild-type” pero no frente a los Ob (Figura 23). Este aumento podría ser explicado como un mecanismo compensatorio activado frente a una agresión oxidativa. Así, ante la agresión oxidativa y la destrucción de algunas moléculas de GSSG, se inicia la producción GSH *de novo* a partir de la unión de glicina a la  $\gamma$ -glutamilcisteína, sintetizada a partir de la unión de los aminoácidos glutamato y L-Cisteína por acción de la glutamato cisteína ligasa [276]. Wlodek y Rommelspasher,

observaron el fenómeno de formación de GSH *de novo* al tratar a un modelo animal de ratón con derivados de tiazolidina, que actuaban como precursores del GSH, consiguiendo una mejora en los marcadores de estrés oxidativo. En cambio, los ratones a los que no se les administraba el precursor, fallaban en el sostenimiento de la defensa antioxidante [277].

La necesidad de mantener los niveles de GSH para garantizar una adecuada defensa antioxidante intracelular podría explicar tanto los datos observados sobre la concentración de L-Cisteína, como los datos de actividad de la enzima GR y los de GSSG, en los ratones Ob-E. Estos animales con presentan una combinación de dos factores que se han asociado ampliamente a la aparición de estrés oxidativo ([59], [69], [125], [170]). Aunque en nuestro estudio no hemos podido confirmar la presencia de estrés oxidativo, la actividad de la enzima GR es mayor en los ratones Ob-E al tiempo que la cantidad de GSSG en sus cerebros es la más reducida. Sin embargo, este aumento no puede ser atribuido únicamente al consumo de alcohol etílico, ya que la diferencia en concentración de L-Cisteína en los ratones que Ob-E y E frente a sus respectivos controles no es significativa. Del mismo modo, tampoco se puede atribuir este aumento a la genética de los ratones mutantes, ya que no se observa diferencia significativa entre los grupos “wild-type” y los grupos mutantes, por lo que el aumento en la concentración de L-Cisteína podría ser atribuido a la combinación de ambas patologías: consumo de alcohol etílico y MetS.

### iii. MDA

En las células, cuando se produce una agresión oxidativa, y la defensa antioxidante no es capaz de reestablecer el equilibrio redox celular, existe un desequilibrio entre las especies ROS y las defensa antioxidante, produciéndose un exceso de radicales como el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) [278]. Cuando este radical se genera en las proximidades de las membranas celulares, ataca a los ácidos grasos poliinsaturados que forman los

fosfolípidos, destruyendo la membrana celular y generando una reacción en cadena en la que se obtiene MDA como subproducto. Por este motivo, el MDA es un buen indicador del daño celular causado por el estrés oxidativo [171], [172], [242].

En cuanto a los datos de peroxidación lipídica y formación de MDA, no se hallaron diferencias significativas en las concentraciones de MDA entre los distintos grupos de estudio (Figura 24).

A pesar de que los datos muestran que existe una agresión oxidativa al cerebro y que los mecanismos compensatorios redox están activos, no se aprecia un aumento del daño celular y la apoptosis, tal y como se puede deducir de las concentraciones de MDA. Estos resultados estarían alineados con los resultados conductuales, en los que no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos para la memoria a corto y largo plazo.

Cuando el mecanismo compensatorio celular al estrés oxidativo falla porque no hay capacidad para reponer la enzima GSH, se produce daño oxidativo severo, con un aumento de los niveles de MDA, que se traduce en daño cognitivo, tal y como observaron Johnsen-Soriano y sus colaboradores en el hipocampo de ratas alimentadas con dieta Lieber-DeCarli con alcohol etílico 6,4% [268]. Este efecto también fue observado por Wlodek y Rommelspasher, quienes observaron como la concentración de glutatión total disminuía al tiempo que aumentaba la cantidad de MDA en ratones a los que se les administró alcohol etílico durante cinco días por una sonda gástrica con concentraciones entre 5 y 6 g/kg y día [277]. Además, también observaron un aumento de los niveles de glutatión total y una reducción de la peroxidación lipídica (a través de una reducción de la concentración de MDA) en estos ratones cuando se les trataba con derivados de la tiazolidina, que actuaban como precursores del GSH.

Por tanto, en la literatura sí que se describe un aumento del daño celular por el estrés oxidativo debido al efecto del alcohol etílico, aunque en nuestro caso no hemos observado este fenómeno, posiblemente porque el sistema antioxidante todavía es capaz de mantener la defensa frente a la agresión oxidativa. Otra explicación de la discrepancia hallada respecto a la literatura podría ser la diferencia en el procedimiento de ingesta utilizado o la estirpe utilizada para llevar a cabo los experimentos, ya que el modelo ratón utilizado podría tener una predisposición genética a una mejor defensa antioxidante que otras especies de roedor.

En resumen, cuando la defensa antioxidante falla en la acción frente a las agresiones oxidativas, se produce daño celular y peroxidación lipídica. El MDA es uno de los marcadores de peroxidación lipídica en las células. En nuestro estudio no se hallaron diferencias significativas en la concentración de MDA para los distintos grupos de estudio, posiblemente porque la defensa antioxidante sigue siendo capaz de contrarrestar las agresiones oxidativas con el sistema del glutatión.

#### iv. Resumen

Los datos de estrés oxidativo obtenidos en este estudio muestran que existe un mecanismo de compensación y defensa frente a las agresiones oxidativas. Ante una agresión oxidativa, el sistema glutatión se activa neutralizando las amenazas a partir de la oxidación del GSH a GSSG mediante la acción de la enzima GPx. Para mantener el poder antioxidante de este sistema, la concentración de GSH es mantenida a través de la acción de la enzima GR, que reduce el GSSG a GSH y la formación de GSH *de novo* a partir de precursores como la L-Cisteína. Cuando la defensa antioxidante falla, se produce peroxidación lipídica y daño celular, que es observable a partir de la formación de MDA.

En nuestro estudio, no se observa un aumento significativo de la MDA pero sí la activación del sistema del glutatión a través de la actividad de la GR y las concentraciones de GSH, GSSG y la relación entre ellas. Además, también se observa el aumento de la concentración de L-Cisteína, lo que apunta a que la falta de daño oxidativo es consecuencia de que la célula todavía es capaz de hacer frente a la agresión oxidativa.

#### d. EFECTOS DE LA ACCIÓN COMBINADA DEL METS Y EL ABUSO DE ALCOHOL ETÍLICO

Tal y como se describe en el marco teórico, no existe un consenso científico respecto a si el consumo de bebidas alcohólicas favorece o reduce la posibilidad de sufrir T2D en pacientes con MetS. En nuestro experimento, el consumo crónico de alcohol etílico reduce los niveles de glucemia en sangre, ejerciendo un efecto protector frente al desarrollo de la T2D, sin afectar a los niveles de secreción de insulina, o al menos, a los niveles de insulina en el torrente sanguíneo.

A la vista de los resultados de la sobrecarga de glucosa, del control de glucemia basal y de los niveles de insulina de los animales usados en el experimento, parece que gana fuerza la hipótesis de que las mejoras relacionadas con la protección frente al desarrollo de la T2D son debidas a la reducción de la glucogenólisis y gluconeogénesis causadas por el alcohol etílico, produciendo una reducción de los niveles de glucosa en sangre. Además, tal y como hemos observado, no se produce una modificación de la secreción de insulina, que no se ve aumentada ni reducida por efecto del consumo crónico de alcohol etílico. Tampoco se observa un aumento a la sensibilidad a la insulina, que implicaría un mejor comportamiento en la sobrecarga de glucosa o una reducción de la secreción de insulina, ya que no serían necesarios niveles tan elevados de insulina circulante para producir el mismo efecto.

Del mismo modo, el consumo crónico de alcohol etílico en nuestro modelo de MetS activó el mecanismo de defensa antioxidante, produciendo una respuesta suficiente para compensar la agresión oxidativa y evitar la apoptosis de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos [84], que ha sido relacionada con las especies ROS producidas por el metabolismo del alcohol etílico [141], [178], [202]; lo que puede explicar por qué no se



observa una disminución de los islotes pancreáticos y de la secreción de insulina en nuestro modelo.

La activación observada de la defensa antioxidante y el mecanismo compensatorio también parece evitar los daños cognitivos asociados al consumo de alcohol etílico [128], ya que no se observa un aumento de productos de peroxidación lipídica (MDA) en las muestras de cerebro extraídas de los animales de este estudio, como tampoco se aprecia daño cognitivo en la memoria a largo y corto plazo en el *Novel object recognition test*.

A pesar de los resultados descritos en esta tesis, es necesario profundizar en los procesos que nos permitirán elucidar cuál es el mecanismo de acción por el cual el alcohol etílico modifica algunos de los factores que afectan al MetS, tales como la secreción de insulina, el estrés oxidativo o el estado glucémico, por lo que siguen siendo necesarios más experimentos para determinarlos. Entre los parámetros a estudiar, se encuentra la dosis de alcohol etílico administrada y el modelo de ingesta, ya que muchos de los efectos descritos son dependientes de estos factores, siendo peores los consumos abusivos en cortos períodos de tiempo que el mismo consumo moderado a lo largo del tiempo [177]. También sería interesante recoger más datos en los próximos experimentos para ver como varían debido al consumo de alcohol etílico. Datos como, por ejemplo, más marcadores de estrés oxidativo e inflamación, como grupos carbonilo o 8-hidroxi-desoxiguanosina (8OHdG) y el TNF- $\alpha$ ; valores metabólicos relacionados con el MetS, como el HDL, LDL o FFA; o más datos cognitivos a través del uso de diferentes test conductuales, como el laberinto de agua de Morris.



## **LIMITACIONES**



Las principales limitaciones que hemos encontrado tras realizar este estudio son las siguientes:

El modelo ratón *ob/ob* tiene como limitación que los ratones *ob/ob* estabilizan los valores de glucemia a unos valores de normoglucemia a partir de los 6 meses de edad [223], con lo que no es posible estudiar los efectos a largo plazo del consumo de alcohol etílico en el MetS y sería necesario cambiar de modelo animal de MetS.

Otra limitación es la complicación de determinar el nivel de intoxicación etílica alcanzado por cada ratón, ya que el consumo de alcohol etílico de cada ratón es una estimación basada en el consumo de todos los ratones de la caja. Por tanto, sólo es posible obtener medidas reales del grado de alcohol en sangre de los ratones en el momento de su sacrificio, debido a la cantidad de sangre necesaria para realizar los inmunoensayos.

En futuros experimentos se incluirá la determinación y análisis de más marcadores de inflamación y muerte celular, así como valores de hemoglobina glicosilada y valores metabólicos relacionados con el MetS, como el HDL, LDL o FFA, para ayudar a la interpretación de resultados.



## **CONCLUSIONES**





A la vista de los resultados discutidos de en los apartados anteriores puede afirmarse que el consumo crónico de alcohol etílico induce cambios en los parámetros estudiados en nuestro modelo ratón de MetS. De manera más específica, las conclusiones que se obtienen en el presente trabajo son las siguientes :

#### 1. EFECTOS EN LA MEMORIA

El consumo crónico de alcohol etílico durante seis semanas no afecta a las funciones cognitivas, de aprendizaje y memoria a corto y largo plazo, de ratones con MetS en nuestro modelo experimental.

#### 2. SECRECIÓN Y RESPUESTA A LA INSULINA

El consumo crónico de alcohol etílico no afecta a la secreción de insulina en nuestro modelo de ratón con MetS aunque sí se observa una alteración en la respuesta a la misma.

#### 3. ESTADO GLUCÉMICO

El consumo crónico de alcohol etílico induce una reducción de los valores de glucemia basal en nuestro modelo animal de MetS junto con un incremento de la glucemia postprandial.

#### 4. SISTEMA ANTIOXIDANTE

El consumo crónico de alcohol etílico induce una alteración del estado oxidativo en el cerebro de ratones *ob/ob*, consistente en un incremento de la actividad de la enzima antioxidante GR sin que llegue a observarse un incremento de la peroxidación lipídica. Este cambio sugiere la activación de un mecanismo compensatorio frente a la agresión oxidativa inducida por el alcohol etílico en ratones con MetS en nuestro modelo experimental.







**ANEXOS**



# ANEXO I: Autorización Procedimiento Experimentación Animal



## **Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca**

Ciutat Administrativa 9 d'Octubre  
Calle de La Democracia, 77 · Edif. B3 P2  
46018 València



### **AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2019/VSC/PEA/0053**

Vista la solicitud realizada en fecha **06/03/19** con nº reg. entrada **135100** por D/D<sup>a</sup>. **Jesús Lancis Sáez, Vicerector d' Investigació i Transferència**, centro usuario **ES120400001002**, para realizar el procedimiento:

***“ Síndrome metabólico y abuso de alcohol: efectos de la acción combinada de ambas patologías sobre el sistema nervioso central.”***

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

### **AUTORIZO:**

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2019/VSC/PEA/0053** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat Jaume I Castellon**

Responsable del proyecto: **Maria Edo Muriach Sauri**

Establecimiento: **Servicio de Experimentación Animal**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica  
El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Firmat per Rogelio Llanes Ribas  
11/03/2019 17:15:30  
Càrrec: Direcció General





## **BIBLIOGRAFÍA**



- [1] "International classification of diseases-World Health Organization (WHO)." Accessed: Oct. 16, 2021. [Online]. Available: <https://www.who.int/standards/classifications/classification-of-diseases>
- [2] K. Alberti and P. Zimmet, "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation," *Diabetic Medicine*, vol. 15, no. 7, pp. 539–553, Jul. 1998, doi: 10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S.
- [3] G. Reaven, "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease," *Diabetes*, vol. 37, pp. 1595–1607, 1988.
- [4] R. De Fronzo and E. Ferrannini, "Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease," *Diabetes Care*, vol. 14, pp. 173–194, 1991.
- [5] N. Kaplan, "The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension," *archives of Intern Medicine*, vol. 149, pp. 1514–1520, 1989.
- [6] R. H. Eckel, S. M. Grundy, and P. Z. Zimmet, "The metabolic syndrome," *The Lancet*, vol. 365, no. 9468, pp. 1415–1428, Apr. 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)66378-7.
- [7] E. Kylin, "Studien über das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämie-Syndrom.," *Zentralblatt für Innere Medizin.*, vol. 44, pp. 105–27, 1923.
- [8] J. Vague, "La différentiation sexuelle, facteur déterminant des formes de l'obésité.," *Presse Medicale*, vol. 30, pp. 339–340, 1947.
- [9] H. Haller, "[Epidemiology and associated risk factors of hyperlipoproteinemia]," *Z Gesamte Inn Med*, vol. 32, no. 8, pp. 124–128, Apr. 1977, Accessed: Sep. 29, 2021. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/883354/>
- [10] P. Singer, "Zur Diagnostik der primären Hyperlipoproteinämien [Diagnosis of primary hyperlipoproteinemias].," *Z Gesamte Inn Med.*, vol. 32, no. 9, pp. 129–133, 1977, Accessed: Sep. 29, 2021. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/906591/>
- [11] G. B. Phillips, "Relationship between serum sex hormones and glucose, insulin and lipid abnormalities in men with myocardial infarction.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 74, no. 4, p. 1729, 1977, doi: 10.1073/PNAS.74.4.1729.
- [12] E. Goodman, "Pediatric metabolic syndrome: Smoke and mirrors or true magic?," *J Pediatr*, vol. 148, no. 2, pp. 149–151, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.jpeds.2005.08.057.
- [13] B. Balkau and M. A. Charles, "Comment on the provisional report from the WHO consultation," *Diabetic Medicine*, vol. 16, no. 5, pp. 442–443, May 1999, doi: 10.1046/j.1464-5491.1999.00059.x.
- [14] "Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)," *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, vol. 285, no. 19, pp. 2486–2497, May 2001, doi: 10.1001/jama.285.19.2486.

- [15] K. Alberti *et al.*, “Harmonizing the Metabolic Syndrome,” *Circulation*, vol. 120, no. 16, pp. 1640–1645, Oct. 2009, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
- [16] S. L. Samson and A. J. Garber, “Metabolic Syndrome,” *Endocrinol Metab Clin North Am*, vol. 43, no. 1, pp. 1–23, Mar. 2014, doi: 10.1016/J.ECL.2013.09.009.
- [17] D. Einhorn *et al.*, “American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome.,” in *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, 2003, pp. 237–252. doi: 10.4158/ep.9.s2.5.
- [18] S. M. Grundy, J. H. Bryan Brewer, J. I. Cleeman, J. Sidney C. Smith, and C. Lenfant, “Definition of Metabolic Syndrome,” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 24, no. 2, pp. 433–438, Feb. 2004, doi: 10.1161/01.ATV.0000111245.75752.C6.
- [19] International Diabetes Federation, “The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome,” Brussels, Belgium, 2006. Accessed: Mar. 28, 2019. [Online]. Available: file:///C:/Users/romeror/Downloads/IDF\_Meta\_def\_final.pdf
- [20] A. Engin, “The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome,” in *Obesity and Lipotoxicity. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, 2017, pp. 1–17. doi: 10.1007/978-3-319-48382-5\_1.
- [21] P. Zimmet, K. G. M M Alberti, and M. Serrano Ríos, “[A new international diabetes federation worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and the results].,” *Rev Esp Cardiol*, vol. 58, no. 12, pp. 1371–6, Dec. 2005.
- [22] A. Gupta and V. Gupta, “Metabolic syndrome: What are the risks for humans?,” *Biosci Trends*, vol. 4, no. 5, pp. 204–212, 2010, Accessed: Oct. 05, 2021. [Online]. Available: www.biosciencetrends.com
- [23] S. M. Grundy, “Metabolic Syndrome Pandemic,” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 28, no. 4, pp. 629–636, Apr. 2008, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151092.
- [24] G. Hu, “Prevalence of the Metabolic Syndrome and Its Relation to All-Cause and Cardiovascular Mortality in Nondiabetic European Men and Women,” *Arch Intern Med*, vol. 164, no. 10, p. 1066, May 2004, doi: 10.1001/archinte.164.10.1066.
- [25] S. Guo, “Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms,” *Journal of Endocrinology*, vol. 220, no. 2, pp. T1–T23, Feb. 2014, doi: 10.1530/JOE-13-0327.
- [26] M.-Y. M. Leung, L. M. Pollack, G. A. Colditz, and S.-H. Chang, “Life Years Lost and Lifetime Health Care Expenditures Associated With Diabetes in the U.S., National Health Interview Survey, 1997–2000,” *Diabetes Care*, vol. 38, no. 3, pp. 460–468, Mar. 2015, doi: 10.2337/dc14-1453.
- [27] E. Kassi, P. Pervanidou, G. Kaltsas, and G. Chrousos, “Metabolic syndrome: definitions and controversies,” *BMC Med*, vol. 9, no. 1, p. 48, Dec. 2011, doi: 10.1186/1741-7015-9-48.
- [28] E. S. Ford, C. Li, and N. Sattar, “Metabolic Syndrome and Incident Diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 31, no. 9, pp. 1898–1904, Sep. 2008, doi: 10.2337/dc08-0423.

- [29] E. Thackrey, J. Chen, C.-R. Martino, and V. Preda, "The effects of diet on weight and metabolic outcomes in patients with double diabetes: A systematic review," *Nutrition*, vol. 94, p. 111536, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.nut.2021.111536.
- [30] P. Hossain, B. Kavar, and M. El Nahas, "Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge," <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMp068177>, vol. 356, no. 3, pp. 213–215, Oct. 2009, doi: 10.1056/NEJMp068177.
- [31] M. G. Saklayen, "The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome," *Curr Hypertens Rep*, vol. 20, no. 2, p. 12, Feb. 2018, doi: 10.1007/s11906-018-0812-z.
- [32] E. Cione, M. Cristina Caroleo, R. Cannataro, M. Perri, A. Pingitore, and G. Genchi, "Vitamin A and Diabetes: New Insight for Drug Discovery," *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 9, pp. 738–742, Apr. 2016, doi: 10.2174/1389557515666150709112822.
- [33] P. Saeedi *et al.*, "Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition," *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 157, p. 107843, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
- [34] Y. L. Chung and Y.-J. Rhie, "Severe Obesity in Children and Adolescents: Metabolic Effects, Assessment, and Treatment," *J Obes Metab Syndr*, vol. 30, no. 4, pp. 326–335, Dec. 2021, doi: 10.7570/jomes21063.
- [35] N. Pérez-Farinós *et al.*, "The ALADINO Study: A National Study of Prevalence of Overweight and Obesity in Spanish Children in 2011," *Biomed Res Int*, vol. 2013, pp. 1–7, 2013, doi: 10.1155/2013/163687.
- [36] T. M. A. Wijnhoven *et al.*, "WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative 2008: weight, height and body mass index in 6-9-year-old children," *Pediatr Obes*, vol. 8, no. 2, pp. 79–97, Apr. 2013, doi: 10.1111/j.2047-6310.2012.00090.x.
- [37] T. M. Wijnhoven *et al.*, "WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative: body mass index and level of overweight among 6–9-year-old children from school year 2007/2008 to school year 2009/2010," *BMC Public Health*, vol. 14, no. 1, p. 806, Dec. 2014, doi: 10.1186/1471-2458-14-806.
- [38] R. M. Mabry, M. M. Reeves, E. G. Eakin, and N. Owen, "Gender differences in prevalence of the metabolic syndrome in Gulf Cooperation Council Countries: a systematic review," *Diabetic Medicine*, vol. 27, no. 5, pp. 593–597, May 2010, doi: 10.1111/j.1464-5491.2010.02998.x.
- [39] J. X. Moore, N. Chaudhary, and T. Akinyemiju, "Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–2012," *Prev Chronic Dis*, vol. 14, p. 160287, Mar. 2017, doi: 10.5888/pcd14.160287.
- [40] G. Hirode and R. J. Wong, "Trends in the Prevalence of Metabolic Syndrome in the United States, 2011-2016," *JAMA*, vol. 323, no. 24, p. 2526, Jun. 2020, doi: 10.1001/jama.2020.4501.
- [41] L. A. Hoveling, A. C. Liefbroer, U. Bültmann, and N. Smidt, "Socioeconomic differences in metabolic syndrome development: examining the mediating role of chronic stress

- using the Lifelines Cohort Study,” *BMC Public Health*, vol. 22, no. 1, p. 261, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12889-022-12684-1.
- [42] The GBD 2015 Obesity Collaborators, “Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years,” *New England Journal of Medicine*, vol. 377, no. 1, pp. 13–27, Jul. 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1614362.
- [43] B. Liu, G. Chen, R. Zhao, D. Huang, and L. Tao, “Temporal trends in the prevalence of metabolic syndrome among middle-aged and elderly adults from 2011 to 2015 in China: the China health and retirement longitudinal study (CHARLS),” *BMC Public Health*, vol. 21, no. 1, p. 1045, Dec. 2021, doi: 10.1186/s12889-021-11042-x.
- [44] R. Nagrani *et al.*, “Association of urinary and ambient black carbon, and other ambient air pollutants with risk of prediabetes and metabolic syndrome in children and adolescents,” *Environmental Pollution*, vol. 317, p. 120773, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.envpol.2022.120773.
- [45] K. Esposito, P. Chiodini, A. Colao, A. Lenzi, and D. Giugliano, “Metabolic Syndrome and Risk of Cancer,” *Diabetes Care*, vol. 35, no. 11, pp. 2402–2411, Nov. 2012, doi: 10.2337/dc12-0336.
- [46] A. S. Karadag and M. J. Lavery, “Skin and the metabolic syndrome,” *Clin Dermatol*, vol. 36, no. 1, pp. 1–2, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.001.
- [47] L. Guerrios-Rivera *et al.*, “Metabolic syndrome is associated with aggressive prostate cancer regardless of race,” *Cancer Causes & Control*, vol. 34, no. 3, pp. 213–221, Mar. 2023, doi: 10.1007/s10552-022-01649-9.
- [48] D. L. Mendrick *et al.*, “Metabolic Syndrome and Associated Diseases: From the Bench to the Clinic,” *Toxicological Sciences*, vol. 162, no. 1, pp. 36–42, Mar. 2018, doi: 10.1093/toxsci/kfx233.
- [49] A.-L. Borel, “Sleep Apnea and Sleep Habits: Relationships with Metabolic Syndrome,” *Nutrients*, vol. 11, no. 11, p. 2628, Nov. 2019, doi: 10.3390/nu11112628.
- [50] R. Pasquali, “Metabolic Syndrome in Polycystic Ovary Syndrome,” 2018, pp. 114–130. doi: 10.1159/000485995.
- [51] S. S. Lim *et al.*, “Metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review, meta-analysis and meta-regression,” *Obesity Reviews*, vol. 20, no. 2, pp. 339–352, Feb. 2019, doi: 10.1111/obr.12762.
- [52] F. Locatelli, P. Pozzoni, and L. Del Vecchio, “Renal Manifestations in the Metabolic Syndrome,” *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 17, no. 4\_suppl\_2, pp. S81–S85, Apr. 2006, doi: 10.1681/ASN.2005121332.
- [53] O. Godin *et al.*, “3-year incidence and predictors of metabolic syndrome in schizophrenia in the national FACE-SZ cohort,” *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, vol. 120, p. 110641, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.pnpbp.2022.110641.
- [54] P. Muñoz-Calero Franco *et al.*, “[METABOLIC SYNDROME AND CARDIOVASCULAR RISK IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA, BIPOLAR DISORDER AND SCHIZOAFFECTIVE DISORDER].,” *Nutr Hosp*, vol. 32, no. 6, pp. 2715–7, Dec. 2015, doi: 10.3305/nh.2015.32.6.9951.

- [55] Y. Yu. Borshchev, Y. P. Uspensky, and M. M. Galagudza, "Pathogenetic pathways of cognitive dysfunction and dementia in metabolic syndrome," *Life Sci*, vol. 237, p. 116932, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.lfs.2019.116932.
- [56] J. Drelichowska, W. Kwiatkowska, B. Knysz, and W. Witkiewicz, "Metabolic syndrome in HIV-positive patients," *HIV & AIDS Review*, vol. 14, no. 2, pp. 35–41, 2015, doi: 10.1016/j.hivar.2014.09.002.
- [57] J. Verhelst *et al.*, "Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in 2479 hypopituitary patients with adult-onset GH deficiency before GH replacement: a KIMS analysis," *Eur J Endocrinol*, vol. 165, no. 6, pp. 881–889, Dec. 2011, doi: 10.1530/EJE-11-0599.
- [58] J. Seufert, "Leptin Effects on Pancreatic  $\beta$ -Cell Gene Expression and Function," *Diabetes*, vol. 53, no. suppl\_1, pp. S152–S158, Feb. 2004, doi: 10.2337/diabetes.53.2007.S152.
- [59] A. M. James, Y. Collins, A. Logan, and M. P. Murphy, "Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome," *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 23, no. 9, pp. 429–434, 2012, doi: 10.1016/j.tem.2012.06.008.
- [60] J.-P. Després and I. Lemieux, "Abdominal obesity and metabolic syndrome," *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 881–887, Dec. 2006, doi: 10.1038/nature05488.
- [61] V. Adiposity, I. Not, C. Related, and I. Resistance, "Counterpoint : Visceral Adiposity Is Not," vol. 28, no. 9, 2005.
- [62] I. J. Neeland *et al.*, "Associations of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue with markers of cardiac and metabolic risk in obese adults," *Obesity*, vol. 21, no. 9, pp. E439–E447, Sep. 2013, doi: 10.1002/oby.20135.
- [63] R. S. Ahima and J. S. Flier, "Leptin," *Annu Rev Physiol*, vol. 62, no. 1, pp. 413–437, Mar. 2000, doi: 10.1146/annurev.physiol.62.1.413.
- [64] Y. Matsuzawa, "The role of fat topology in the risk of disease," *Int J Obes*, vol. 32, no. S7, pp. S83–S92, Dec. 2008, doi: 10.1038/ijo.2008.243.
- [65] U. Mabalirajan and B. Ghosh, "Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome and asthma," *J Allergy (Cairo)*, vol. 2013, no. Suppl 1, p. 340476, 2013, doi: 10.1155/2013/340476.
- [66] Y. Lu *et al.*, "The Functional Role of Lipoproteins in Atherosclerosis: Novel Directions for Diagnosis and Targeting Therapy.," *Aging Dis*, vol. 13, no. 2, pp. 491–520, Apr. 2022, doi: 10.14336/AD.2021.0929.
- [67] M. R. Hayden, "Overview and New Insights into the Metabolic Syndrome: Risk Factors and Emerging Variables in the Development of Type 2 Diabetes and Cerebrocardiovascular Disease," *Medicina (B Aires)*, vol. 59, no. 3, p. 561, Mar. 2023, doi: 10.3390/medicina59030561.
- [68] D. Nikolic, N. Katsiki, G. Montalto, E. Isenovic, D. Mikhailidis, and M. Rizzo, "Lipoprotein Subfractions in Metabolic Syndrome and Obesity: Clinical Significance and Therapeutic Approaches," *Nutrients*, vol. 5, no. 3, pp. 928–948, Mar. 2013, doi: 10.3390/nu5030928.
- [69] R. P. Robertson, J. Harmon, P. O. T. Tran, and V. Poitout, "Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes.," *Diabetes*, vol. 53 Suppl 1,

pp. S119-24, Feb. 2004, Accessed: Apr. 08, 2019. [Online]. Available:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749276>

- [70] R. P. Robertson, "Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes," *Curr Opin Pharmacol*, vol. 6, no. 6, pp. 615–619, 2006, doi: 10.1016/j.coph.2006.09.002.
- [71] C. K. Roberts, A. L. Hevener, and R. J. Barnard, "Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training," *Compr Physiol*, pp. 1–58, Jan. 2013, doi: 10.1002/cphy.c110062.
- [72] T. B. Cruz *et al.*, "Mice with Type 2 Diabetes Present Significant Alterations in Their Tissue Biomechanical Properties and Histological Features," *Biomedicines*, vol. 10, no. 1, p. 57, Dec. 2021, doi: 10.3390/biomedicines10010057.
- [73] E. Cione, R. Cannataro, L. Gallelli, G. De Sarro, and M. C. Caroleo, "Exosome microRNAs in Metabolic Syndrome as Tools for the Early Monitoring of Diabetes and Possible Therapeutic Options," *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 12, p. 1257, Dec. 2021, doi: 10.3390/ph14121257.
- [74] I. C. Mcmillen and J. S. Robinson, "Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming," *Physiol Rev*, vol. 85, no. 2, pp. 571–633, Apr. 2005, doi: 10.1152/physrev.00053.2003.
- [75] J. Kaur, "A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome," *Cardiol Res Pract*, vol. 2014, pp. 1–21, 2014, doi: 10.1155/2014/943162.
- [76] R. Weiss *et al.*, "Obesity and the Metabolic Syndrome in Children and Adolescents," *New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 23, pp. 2362–2374, Jun. 2004, doi: 10.1056/NEJMoa031049.
- [77] S. Castro-Barquero *et al.*, "Loss of Visceral Fat is Associated with a Reduction in Inflammatory Status in Patients with Metabolic Syndrome," *Mol Nutr Food Res*, vol. 67, no. 4, p. 2200264, Feb. 2023, doi: 10.1002/mnfr.202200264.
- [78] W. W. Pan and M. G. Myers, "Leptin and the maintenance of elevated body weight," *Nat Rev Neurosci*, vol. 19, no. 2, pp. 95–105, Feb. 2018, doi: 10.1038/nrn.2017.168.
- [79] J. Konieczna *et al.*, "Does Consumption of Ultra-Processed Foods Matter for Liver Health? Prospective Analysis among Older Adults with Metabolic Syndrome," *Nutrients*, vol. 14, no. 19, p. 4142, Oct. 2022, doi: 10.3390/nu14194142.
- [80] M. V. Potenza and J. I. Mechanick, "The Metabolic Syndrome," *Nutrition in Clinical Practice*, vol. 24, no. 5, pp. 560–577, Oct. 2009, doi: 10.1177/0884533609342436.
- [81] N. Babio, M. Bulló, and J. Salas-Salvadó, "Mediterranean diet and metabolic syndrome: the evidence," *Public Health Nutr*, vol. 12, no. 9A, pp. 1607–1617, Sep. 2009, doi: 10.1017/S1368980009990449.
- [82] M. Veissi, R. Anari, R. Amani, H. Shahbazian, and S. M. Latifi, "Mediterranean diet and metabolic syndrome prevalence in type 2 diabetes patients in Ahvaz, southwest of Iran," *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, vol. 10, no. 2, pp. S26–S29, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.DSX.2016.01.015.
- [83] D. M. Bravata *et al.*, "Efficacy and Safety of Low-Carbohydrate Diets," *JAMA*, vol. 289, no. 14, p. 1837, Apr. 2003, doi: 10.1001/jama.289.14.1837.



- [84] J. Jalali and M. Ghasemzadeh Rahbardar, "Ameliorative effects of *Portulaca oleracea* L. (purslane) on the metabolic syndrome: A review," *J Ethnopharmacol*, vol. 299, p. 115672, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.jep.2022.115672.
- [85] X. Zhang, X. Song, X. Hu, F. Chen, and C. Ma, "Health benefits of proanthocyanidins linking with gastrointestinal modulation: An updated review," *Food Chem*, vol. 404, p. 134596, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134596.
- [86] Y. Ye *et al.*, "Tea Polyphenols Attenuates Inflammation via Reducing Lipopolysaccharides Level and Inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B Pathway in Obese Mice," *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 77, no. 1, pp. 105–111, Mar. 2022, doi: 10.1007/s11130-021-00937-0.
- [87] J. C. Miller *et al.*, "Gut Microbes Are Associated with the Vascular Beneficial Effects of Dietary Strawberry on Metabolic Syndrome-Induced Vascular Inflammation," *Mol Nutr Food Res*, vol. 66, no. 22, p. 2200112, Nov. 2022, doi: 10.1002/mnfr.202200112.
- [88] J. Myers, P. Kokkinos, and E. Nyelin, "Physical Activity, Cardiorespiratory Fitness, and the Metabolic Syndrome," *Nutrients*, vol. 11, no. 7, p. 1652, Jul. 2019, doi: 10.3390/nu11071652.
- [89] E. Kelley, M. T. Imboden, M. P. Harber, H. Finch, L. A. Kaminsky, and M. H. Whaley, "Cardiorespiratory Fitness Is Inversely Associated With Clustering of Metabolic Syndrome Risk Factors: The Ball State Adult Fitness Program Longitudinal Lifestyle Study," *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes*, vol. 2, no. 2, pp. 155–164, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.mayocpiqo.2018.03.001.
- [90] F. F. Lillich, J. D. Imig, and E. Proschak, "Multi-Target Approaches in Metabolic Syndrome," *Front Pharmacol*, vol. 11, Mar. 2021, doi: 10.3389/fphar.2020.554961.
- [91] M. B. Davidson, "Historical review of the diagnosis of prediabetes/intermediate hyperglycemia: Case for the international criteria," *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 185, p. 109219, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.diabres.2022.109219.
- [92] I. Ayala *et al.*, "Experimental animal models of fatty liver disease and metabolic syndrome," *Anales de Veterinaria*, vol. 24, pp. 5–16, 2008, Accessed: Jun. 08, 2024. [Online]. Available: <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/68991/66421>
- [93] M. A. Alam and M. M. Rahman, "Mitochondrial dysfunction in obesity: potential benefit and mechanism of Co-enzyme Q10 supplementation in metabolic syndrome," *J Diabetes Metab Disord*, vol. 13, no. 1, p. 60, May 2014, doi: 10.1186/2251-6581-13-60.
- [94] A. Cota-Coronado *et al.*, "Implications of human induced pluripotent stem cells in metabolic disorders: from drug discovery toward precision medicine," *Drug Discov Today*, vol. 24, no. 1, pp. 334–341, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2018.10.001.
- [95] Y. Ji *et al.*, "Effect of Bariatric Surgery on Metabolic Diseases and Underlying Mechanisms," *Biomolecules*, vol. 11, no. 11, p. 1582, Oct. 2021, doi: 10.3390/biom11111582.
- [96] C. Roberts, H. Andrea, and J. Barnard, "Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training," *Compr Physiol*, vol. 3, no. 1, pp. 1–58, 2014, doi: 10.1002/cphy.c110062.

- [97] C. Reisinger, B. N. Nkeh-Chungag, P. M. Fredriksen, and N. Goswami, "The prevalence of pediatric metabolic syndrome—a critical look on the discrepancies between definitions and its clinical importance," *Int J Obes*, vol. 45, no. 1, pp. 12–24, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41366-020-00713-1.
- [98] A. T. Titmuss and S. Srinivasan, "Metabolic syndrome in children and adolescents: Old concepts in a young population," *J Paediatr Child Health*, vol. 52, no. 10, pp. 928–934, Oct. 2016, doi: 10.1111/jpc.13190.
- [99] P. Zimmet *et al.*, "The metabolic syndrome in children and adolescents," *The Lancet*, vol. 369, no. 9579, pp. 2059–2061, Jun. 2007, doi: 10.1016/S0140-6736(07)60958-1.
- [100] S. Park *et al.*, "Altered Risk for Cardiovascular Events With Changes in the Metabolic Syndrome Status," *Ann Intern Med*, vol. 171, no. 12, p. 875, Dec. 2019, doi: 10.7326/M19-0563.
- [101] F. Bishehsari, R. M. Voigt, and A. Keshavarzian, "Circadian rhythms and the gut microbiota: from the metabolic syndrome to cancer," *Nat Rev Endocrinol*, vol. 16, no. 12, pp. 731–739, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41574-020-00427-4.
- [102] P. P. Tee, J. S. L. Wong, N. M. Selveindran, and J. Y. H. Hong, "Effect of obesity and excessive body fat on glycaemic control in paediatric type 1 diabetes," *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, vol. 35, no. 12, pp. 1474–1480, Dec. 2022, doi: 10.1515/jpem-2022-0151.
- [103] N. A. E. Isayed *et al.*, "10. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Care in Diabetes—2023," *Diabetes Care*, vol. 46, no. Supplement\_1, pp. S158–S190, Jan. 2023, doi: 10.2337/dc23-S010.
- [104] N. A. El Sayed *et al.*, "12. Retinopathy, Neuropathy, and Foot Care: Standards of Care in Diabetes—2023," *Diabetes Care*, vol. 46, no. Supplement\_1, pp. S203–S215, Jan. 2023, doi: 10.2337/dc23-S012.
- [105] N. A. El Sayed *et al.*, "2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2023," *Diabetes Care*, vol. 46, no. Supplement\_1, pp. S19–S40, Jan. 2023, doi: 10.2337/dc23-S002.
- [106] S. Mayor, "International Diabetes Federation consensus on prevention of type 2 diabetes," *Int J Clin Pract*, vol. 61, no. 10, pp. 1773–1775, Sep. 2007, doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01547.x.
- [107] C. N. Lumeng and A. R. Saltiel, "Inflammatory links between obesity and metabolic disease," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 121, no. 6, pp. 2111–2117, Jun. 2011, doi: 10.1172/JCI57132.
- [108] K. F. Petersen *et al.*, "Mitochondrial Dysfunction in the Elderly: Possible Role in Insulin Resistance," *Science (1979)*, vol. 300, no. 5622, pp. 1140–1142, May 2003, doi: 10.1126/science.1082889.
- [109] C. Gutiérrez-Rodelo, A. Roura-Guiberna, and J. A. Olivares-Reyes, "[Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update].," *Gac Med Mex*, vol. 153, no. 2, pp. 214–228, 2017.
- [110] R. Parish and K. F. Petersen, "Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes.," *Curr Diab Rep*, vol. 5, no. 3, pp. 177–183., 2005, doi: 10.1016/j.bbi.2008.05.010.

- [111] S. Supale, N. Li, T. Brun, and P. Maechler, "Mitochondrial dysfunction in pancreatic  $\beta$  cells," *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 23, no. 9, pp. 477–487, 2012, doi: 10.1016/j.tem.2012.06.002.
- [112] J. Y. Kim *et al.*, "Chronic alcohol consumption potentiates the development of diabetes through pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction.," *World J Biol Chem*, vol. 6, no. 1, pp. 1–15, 2015, doi: 10.4331/wjbc.v6.i1.1.
- [113] Y. Saisho, A. E. Butler, E. Manesso, D. Elashoff, R. A. Rizza, and P. C. Butler, " $\beta$ -Cell Mass and Turnover in Humans," *Diabetes Care*, vol. 36, no. 1, pp. 111–117, Jan. 2013, doi: 10.2337/dc12-0421.
- [114] J. J. Meier *et al.*, " $\beta$ -Cell Replication Is the Primary Mechanism Subservicing the Postnatal Expansion of  $\beta$ -Cell Mass in Humans," *Diabetes*, vol. 57, no. 6, pp. 1584–1594, Jun. 2008, doi: 10.2337/db07-1369.
- [115] S. Yagihashi, W. Inaba, and H. Mizukami, "Dynamic pathology of islet endocrine cells in type 2 diabetes:  $\beta$ -Cell growth, death, regeneration and their clinical implications," *J Diabetes Investig*, vol. 7, no. 2, pp. 155–165, Mar. 2016, doi: 10.1111/jdi.12424.
- [116] T. Mezza *et al.*, "Insulin Resistance Alters Islet Morphology in Nondiabetic Humans," *Diabetes*, vol. 63, no. 3, pp. 994–1007, Mar. 2014, doi: 10.2337/db13-1013.
- [117] J. C. Henquin and J. Rahier, "Pancreatic alpha cell mass in European subjects with type 2 diabetes," *Diabetologia*, vol. 54, no. 7, pp. 1720–1725, Jul. 2011, doi: 10.1007/s00125-011-2118-4.
- [118] K. H. Yoon *et al.*, "Selective  $\beta$ -Cell Loss and  $\alpha$ -Cell Expansion in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Korea," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 88, no. 5, pp. 2300–2308, May 2003, doi: 10.1210/jc.2002-020735.
- [119] S. Yagihashi, H. Mizukami, and W. Inaba, "Quo vadis: Where have the  $\beta$ -cells gone?," *J Diabetes Investig*, vol. 6, no. 4, pp. 393–395, Jul. 2015, doi: 10.1111/jdi.12287.
- [120] T. Brun *et al.*, "Changes in Mitochondrial Carriers Exhibit Stress-Specific Signatures in INS-1E $\beta$ -Cells Exposed to Glucose Versus Fatty Acids," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e82364, Dec. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0082364.
- [121] T. Tanaka *et al.*, "Glucose-stimulated Single Pancreatic Islets Sustain Increased Cytosolic ATP Levels during Initial Ca<sup>2+</sup> Influx and Subsequent Ca<sup>2+</sup> Oscillations," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 4, pp. 2205–2216, Jan. 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.499111.
- [122] G. Zhang *et al.*, "Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$ B and GnRH," *Nature*, vol. 497, no. 7448, pp. 211–216, May 2013, doi: 10.1038/nature12143.
- [123] Q. Meng and D. Cai, "Defective Hypothalamic Autophagy Directs the Central Pathogenesis of Obesity via the I $\kappa$ B Kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ )/NF- $\kappa$ B Pathway," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 37, pp. 32324–32332, Sep. 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.254417.
- [124] C. Guo, L. Sun, X. Chen, and D. Zhang, "Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases.," *Neural Regen Res*, vol. 8, no. 21, pp. 2003–14, Jul. 2013, doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009.

- [125] S. Treviño *et al.*, “A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats,” *Synapse*, vol. 69, no. 9, pp. 421–433, Sep. 2015, doi: 10.1002/syn.21832.
- [126] X. ZHANG, F. DONG, J. REN, M. DRISCOLL, and B. CULVER, “High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex,” *Exp Neurol*, vol. 191, no. 2, pp. 318–325, Feb. 2005, doi: 10.1016/j.expneurol.2004.10.011.
- [127] I. Jialal, H. Kaur, and S. Devaraj, “Toll-like Receptor Status in Obesity and Metabolic Syndrome: A Translational Perspective,” *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 99, no. 1, pp. 39–48, Jan. 2014, doi: 10.1210/jc.2013-3092.
- [128] S. de la Monte, Z. Derdak, and J. R. Wands, “Alcohol, insulin resistance and the liver-brain axis,” *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 27, pp. 33–41, Mar. 2012, doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.07023.x.
- [129] World Health Organization, “Global Status Report on Alcohol and Health 2018 ,” Geneva: Switzerland, 2018. Accessed: May 18, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565639>
- [130] L. E. Díaz Prieto, S. Gómez-martínez, E. Nova, and A. Marcos, “Do we know what moderate alcohol consumption is? The particular case of beer.,” *Nutr Hosp*, 2022, doi: 10.20960/nh.04303.
- [131] H. Hendriks, “Alcohol and Human Health: What Is the Evidence?,” *Annu Rev Food Sci Technol*, vol. 11, no. 1, pp. 1–21, Mar. 2020, doi: 10.1146/annurev-food-032519-051827.
- [132] L. Vonghia, L. Leggio, A. Ferrulli, M. Bertini, G. Gasbarrini, and G. Addolorato, “Acute alcohol intoxication,” *Eur J Intern Med*, vol. 19, no. 8, pp. 561–567, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.ejim.2007.06.033.
- [133] M. Rosenthal and R. Glew, *Medical Biochemistry: Human Metabolism in Health and Disease*. John Wiley & Sons, 2009.
- [134] J. Hyun, J. Han, C. Lee, M. Yoon, and Y. Jung, “Pathophysiological Aspects of Alcohol Metabolism in the Liver,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 11, p. 5717, May 2021, doi: 10.3390/ijms22115717.
- [135] T. Barr, C. Helms, K. Grant, and I. Messaoudi, “Opposing effects of alcohol on the immune system,” *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, vol. 65, pp. 242–251, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.09.001.
- [136] D. Voet, J. G. Voet, and C. W. Pratt, *Fundamentos de bioquímica*, 2nd ed. Buenos Aires: Ed. Panamericana, 2007.
- [137] H. Runggay *et al.*, “Global burden of cancer in 2020 attributable to alcohol consumption: a population-based study,” *Lancet Oncol*, vol. 22, no. 8, pp. 1071–1080, Aug. 2021, doi: 10.1016/S1470-2045(21)00279-5.
- [138] N. A. Osna, T. M. Donohue, and K. K. Kharbanda, “Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management.,” *Alcohol Res*, vol. 38, no. 2, pp. 147–161, 2017.

- [139] S. Jeon and R. Carr, "Alcohol effects on hepatic lipid metabolism," *J Lipid Res*, vol. 61, no. 4, pp. 470–479, Apr. 2020, doi: 10.1194/jlr.R119000547.
- [140] A. V. Samokhvalov, J. Rehm, and M. Roerecke, "Alcohol Consumption as a Risk Factor for Acute and Chronic Pancreatitis: A Systematic Review and a Series of Meta-analyses," *EBioMedicine*, vol. 2, no. 12, pp. 1996–2002, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.ebiom.2015.11.023.
- [141] N. Rachdaoui and D. K. Sarkar, "Pathophysiology of the Effects of Alcohol Abuse on the Endocrine System.," *Alcohol Res*, vol. 38, no. 2, pp. 255–276, 2017.
- [142] S. C. Larsson, N. Orsini, and A. Wolk, "Alcohol consumption and risk of heart failure: a dose-response meta-analysis of prospective studies," *Eur J Heart Fail*, vol. 17, no. 4, pp. 367–373, Apr. 2015, doi: 10.1002/ejhf.228.
- [143] E. Yu *et al.*, "Diet, Lifestyle, Biomarkers, Genetic Factors, and Risk of Cardiovascular Disease in the Nurses' Health Studies," *Am J Public Health*, vol. 106, no. 9, pp. 1616–1623, Sep. 2016, doi: 10.2105/AJPH.2016.303316.
- [144] G. Biała and J. Kotlińska, "Blockade of the acquisition of ethanol-induced conditioned place preference by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists.," *Alcohol and Alcoholism*, vol. 34, no. 2, pp. 175–182, Mar. 1999, doi: 10.1093/alcalc/34.2.175.
- [145] D. M. Lovinger, G. White, and F. F. Weight, "Ethanol Inhibits NMDA-Activated Ion Current in Hippocampal Neurons," *Science (1979)*, vol. 243, no. 4899, pp. 1721–1724, Mar. 1989, doi: 10.1126/science.2467382.
- [146] A. L. Pitel *et al.*, "Genuine Episodic Memory Deficits and Executive Dysfunctions in Alcoholic Subjects Early in Abstinence," *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 31, no. 7, pp. 1169–1178, Jul. 2007, doi: 10.1111/j.1530-0277.2007.00418.x.
- [147] A. L. Pitel, S. H. Segobin, L. Ritz, F. Eustache, and H. Beaunieux, "Thalamic abnormalities are a cardinal feature of alcohol-related brain dysfunction," *Neurosci Biobehav Rev*, vol. 54, pp. 38–45, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.07.023.
- [148] V. Hayes, A. Demirkol, N. Ridley, A. Withall, and B. Draper, "Alcohol-related cognitive impairment: current trends and future perspectives," *Neurodegener Dis Manag*, vol. 6, no. 6, pp. 509–523, Dec. 2016, doi: 10.2217/nmt-2016-0030.
- [149] M. Pascual, J. Montesinos, and C. Guerri, "Role of the innate immune system in the neuropathological consequences induced by adolescent binge drinking," *J Neurosci Res*, vol. 96, no. 5, pp. 765–780, May 2018, doi: 10.1002/jnr.24203.
- [150] A. D'Angelo *et al.*, "Acute alcohol intoxication: a clinical overview.," *Clin Ter*, vol. 173, no. 3, pp. 280–291, May 2022, doi: 10.7417/CT.2022.2432.
- [151] J. M. Boden and D. M. Fergusson, "Alcohol and depression," *Addiction*, vol. 106, no. 5, pp. 906–914, May 2011, doi: 10.1111/j.1360-0443.2010.03351.x.
- [152] R. Visontay, R. T. Rao, and L. Mewton, "Alcohol use and dementia: new research directions," *Curr Opin Psychiatry*, vol. 34, no. 2, pp. 165–170, Mar. 2021, doi: 10.1097/YCO.0000000000000679.
- [153] M. Pascual, P. Baliño, S. Alfonso-Loeches, C. M. G. Aragón, and C. Guerri, "Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced

- neuroinflammatory damage," *Brain Behav Immun*, vol. 25, no. SUPPL. 1, pp. S80–S91, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.bbi.2011.02.012.
- [154] N. L. S. O. Malacco *et al.*, "Chronic ethanol consumption compromises neutrophil function in acute pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection," *Elife*, vol. 9, Jul. 2020, doi: 10.7554/eLife.58855.
- [155] H. Zhang, F. Zhang, Z. Zhu, D. Luong, and G. G. Meadows, "Chronic alcohol consumption enhances iNKT cell maturation and activation," *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 282, no. 2, pp. 139–150, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.taap.2014.11.013.
- [156] P. Gurung *et al.*, "Chronic ethanol induces inhibition of antigen-specific CD8+ but not CD4+ immunodominant T cell responses following *Listeria monocytogenes* inoculation," *J Leukoc Biol*, vol. 85, no. 1, pp. 34–43, Jan. 2009, doi: 10.1189/jlb.0208101.
- [157] J. Romeo, J. Wärnberg, E. Nova, L. E. Díaz, S. Gómez-Martinez, and A. Marcos, "Moderate alcohol consumption and the immune system: A review," *British Journal of Nutrition*, vol. 98, no. S1, pp. S111–S115, Oct. 2007, doi: 10.1017/S0007114507838049.
- [158] N. K. Morojele, S. V. Shenoi, P. A. Shuper, R. S. Braithwaite, and J. Rehm, "Alcohol Use and the Risk of Communicable Diseases," *Nutrients*, vol. 13, no. 10, p. 3317, Sep. 2021, doi: 10.3390/nu13103317.
- [159] S. Popova, D. Dozet, K. Shield, J. Rehm, and L. Burd, "Alcohol's Impact on the Fetus," *Nutrients*, vol. 13, no. 10, p. 3452, Sep. 2021, doi: 10.3390/nu13103452.
- [160] M. R. Hayden and S. C. Tyagi, "Islet redox stress: the manifold toxicities of insulin resistance, metabolic syndrome and amylin derived islet amyloid in type 2 diabetes mellitus," *JOP*, vol. 3, no. 4, pp. 86–108, Jul. 2002, Accessed: Apr. 08, 2019. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110767>
- [161] H. Sies, "Oxidative stress: oxidants and antioxidants," *Exp Physiol*, vol. 82, no. 2, pp. 291–295, Mar. 1997, doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024.
- [162] H. Alkadi, "A Review on Free Radicals and Antioxidants," *Infect Disord Drug Targets*, vol. 20, no. 1, pp. 16–26, Feb. 2020, doi: 10.2174/1871526518666180628124323.
- [163] J. S. Beckman and W. H. Koppenol, "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 271, no. 5, pp. C1424–C1437, Nov. 1996, doi: 10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424.
- [164] S. G. Rhee, "CELL SIGNALING: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a Necessary Evil for Cell Signaling," *Science (1979)*, vol. 312, no. 5782, pp. 1882–1883, 2006, doi: 10.1126/science.1130481.
- [165] T. J. Guzik and R. M. Touyz, "Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension," *Hypertension*, vol. 70, no. 4, pp. 660–667, Oct. 2017, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802.
- [166] A. Shaito *et al.*, "Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases," *Frontiers in Bioscience-Landmark*, vol. 27, no. 3, p. 0105, Mar. 2022, doi: 10.31083/j.fbl2703105.
- [167] D. Cai and T. Liu, "Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF- $\kappa$ B," *Aging*, vol. 4, no. 2, pp. 98–115, Feb. 2012, doi: 10.18632/aging.100431.



- [168] W. E. Stehbens, "Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS," *Exp Mol Pathol*, vol. 77, no. 2, pp. 121–132, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.yexmp.2004.04.007.
- [169] S. Salim, "Minireviews Oxidative Stress and the Central Nervous System," *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS J Pharmacol Exp Ther*, vol. 360, pp. 201–205, 2017, doi: 10.1124/jpet.116.237503.
- [170] B. Hansel *et al.*, "Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 89, no. 10, pp. 4963–4971, 2004, doi: 10.1210/jc.2004-0305.
- [171] V. Nair, C. S. Cooper, D. E. Vietti, and G. A. Turner, "The chemistry of lipid peroxidation metabolites: Crosslinking reactions of malondialdehyde," *Lipids*, vol. 21, no. 1, pp. 6–10, Jan. 1986, doi: 10.1007/BF02534294.
- [172] D. R. Janero, "Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury," *Free Radic Biol Med*, vol. 9, no. 6, pp. 515–540, Jan. 1990, doi: 10.1016/0891-5849(90)90131-2.
- [173] D. Tsikas, "Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges," *Anal Biochem*, vol. 524, pp. 13–30, May 2017, doi: 10.1016/j.ab.2016.10.021.
- [174] D. Del Rio, A. J. Stewart, and N. Pellegrini, "A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress," *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 15, no. 4, pp. 316–328, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.numecd.2005.05.003.
- [175] A. Meister and M. E. Anderson, "GLUTATHIONE," *Annu Rev Biochem*, vol. 52, no. 1, pp. 711–760, Jun. 1983, doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.
- [176] M. Muriach Saurí, "El estrés oxidativo como mecanismo fisiopatológico en la diabetes experimental. Tratamiento con luteína, un antioxidante natural," Universidad CEU - Cardenal Herrera ( España ), Moncada, 2006.
- [177] J. Rehm, G. Gmel, C. T. Sempos, and M. Trevisan, "Alcohol-related morbidity and mortality.," *Alcohol Res Health*, vol. 27, no. 1, pp. 39–51, 2003.
- [178] L.-N. Zhao, L.-P. Hao, X.-F. Yang, C.-J. Ying, D. Yu, and X.-F. Sun, "The diabetogenic effects of excessive ethanol: reducing beta-cell mass, decreasing phosphatidylinositol 3-kinase activity and GLUT-4 expression in rats.," *Br J Nutr*, vol. 101, no. 10, pp. 1467–1473, 2009, doi: 10.1017/S0007114508094646.
- [179] H. Gin, V. Rigalleau, O. Caubet, J. Masquelier, and J. Aubertin, "Effects of red wine, tannic acid, or ethanol on glucose tolerance in non—insulin-dependent diabetic patients and on starch digestibility in vitro," *Metabolism*, vol. 48, no. 9, pp. 1179–1183, Sep. 1999, doi: 10.1016/S0026-0495(99)90135-X.
- [180] N. Y. Elmadhun, A. D. Lassaletta, L. M. Chu, C. Bianchi, and F. W. Sellke, "Vodka and wine consumption in a swine model of metabolic syndrome alters insulin signaling pathways in the liver and skeletal muscle," *Surgery*, vol. 152, no. 3, pp. 414–422, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.surg.2012.06.014.

- [181] L. Liu, Y. Wang, K. S. L. Lam, and A. Xu, "Moderate wine consumption in the prevention of metabolic syndrome and its related medical complications.," *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, vol. 8, no. 2, pp. 89–98, Jun. 2008, Accessed: Apr. 08, 2019. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537695>
- [182] J. Huang, X. Wang, and Y. Zhang, "Specific types of alcoholic beverage consumption and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis," *J Diabetes Investig*, vol. 8, no. 1, pp. 56–68, Jan. 2017, doi: 10.1111/jdi.12537.
- [183] G. de Gaetano *et al.*, "Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document," *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 26, no. 6, pp. 443–467, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.numecd.2016.03.007.
- [184] M. Wei, L. W. Gibbons, T. L. Mitchell, J. B. Kampert, and S. N. Blair, "Alcohol intake and incidence of type 2 diabetes in men.," *Diabetes Care*, vol. 23, no. 1, pp. 18–22, Jan. 2000, doi: 10.2337/diacare.23.1.18.
- [185] R. A. Bell, E. J. Mayer-Davis, M. A. Martin, R. B. D'Agostino, and S. M. Haffner, "Associations between alcohol consumption and insulin sensitivity and cardiovascular disease risk factors: the Insulin Resistance and Atherosclerosis Study.," *Diabetes Care*, vol. 23, no. 11, pp. 1630–1636, Nov. 2000, doi: 10.2337/diacare.23.11.1630.
- [186] J. Steiner, K. Crowell, and C. Lang, "Impact of Alcohol on Glycemic Control and Insulin Action," *Biomolecules*, vol. 5, no. 4, pp. 2223–2246, Sep. 2015, doi: 10.3390/biom5042223.
- [187] D. O. Baliunas *et al.*, "Alcohol as a Risk Factor for Type 2 Diabetes: A systematic review and meta-analysis," *Diabetes Care*, vol. 32, no. 11, pp. 2123–2132, Nov. 2009, doi: 10.2337/dc09-0227.
- [188] X.-H. Li, F. Yu, Y.-H. Zhou, and J. He, "Association between alcohol consumption and the risk of incident type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis," *Am J Clin Nutr*, vol. 103, no. 3, pp. 818–829, Mar. 2016, doi: 10.3945/ajcn.115.114389.
- [189] C. Knott, S. Bell, and A. Britton, "Alcohol Consumption and the Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis of More Than 1.9 Million Individuals From 38 Observational Studies," *Diabetes Care*, vol. 38, no. 9, pp. 1804–1812, Sep. 2015, doi: 10.2337/dc15-0710.
- [190] L. L. J. Koppes, J. M. Dekker, H. F. J. Hendriks, L. M. Bouter, and R. J. Heine, "Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies.," *Diabetes Care*, vol. 28, no. 3, pp. 719–25, Mar. 2005, Accessed: Apr. 08, 2019. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15735217>
- [191] A. A. Howard, J. H. Arnsten, and M. N. Gourevitch, "Effect of alcohol consumption on diabetes mellitus: a systematic review.," *Ann Intern Med*, vol. 140, no. 3, pp. 211–9, Feb. 2004, Accessed: Apr. 07, 2019. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757619>
- [192] H. A. Krebs, R. A. Freedland, R. Hems, and M. Stubbs, "Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol," *Biochemical Journal*, vol. 112, no. 1, pp. 117–124, Mar. 1969, doi: 10.1042/bj1120117.



- [193] A. Avogaro *et al.*, "Ethanol impairs insulin-mediated glucose uptake by an indirect mechanism.," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 81, no. 6, pp. 2285–2290, Jun. 1996, doi: 10.1210/jcem.81.6.8964865.
- [194] B. Fromenty *et al.*, "Chronic Ethanol Consumption Lessens the Gain of Body Weight, Liver Triglycerides, and Diabetes in Obese ob/ob Mice," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 331, no. 1, pp. 23–34, Oct. 2009, doi: 10.1124/jpet.109.155168.
- [195] K. M. Conigrave, B. F. Hu, C. A. Camargo, M. J. Stampfer, W. C. Willett, and E. B. Rimm, "A Prospective Study of Drinking Patterns in Relation to Risk of Type 2 Diabetes Among Men," *Diabetes*, vol. 50, no. 10, pp. 2390–2395, Oct. 2001, doi: 10.2337/diabetes.50.10.2390.
- [196] A. Pietraszek, S. Gregersen, and K. Hermansen, "Alcohol and type 2 diabetes. A review," *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 20, no. 5, pp. 366–375, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.numecd.2010.05.001.
- [197] R. Tetzschner, K. Nørgaard, and A. Ranjan, "Effects of alcohol on plasma glucose and prevention of alcohol-induced hypoglycemia in type 1 diabetes-A systematic review with GRADE," *Diabetes Metab Res Rev*, vol. 34, no. 3, p. e2965, Mar. 2018, doi: 10.1002/dmrr.2965.
- [198] E. A. Nikkilä and M.-R. Taskinen, "Ethanol-induced Alterations of Glucose Tolerance, Postglucose Hypoglycemia, and Insulin Secretion in Normal, Obese, and Diabetic Subjects," *Diabetes*, vol. 24, no. 10, pp. 933–943, Oct. 1975, doi: 10.2337/diab.24.10.933.
- [199] K. A. Hätönen *et al.*, "Modifying effects of alcohol on the postprandial glucose and insulin responses in healthy subjects," *Am J Clin Nutr*, vol. 96, no. 1, pp. 44–49, Jul. 2012, doi: 10.3945/ajcn.111.031682.
- [200] V. A. Nguyen, T. Le, M. Tong, E. Silbermann, F. Gundogan, and S. M. de la Monte, "Impaired Insulin/IGF Signaling in Experimental Alcohol-Related Myopathy," *Nutrients*, vol. 4, no. 8, pp. 1058–1075, Aug. 2012, doi: 10.3390/nu4081058.
- [201] P. Baliño, J. C. Ledesma, and C. M. G. Aragon, "In Vivo Study of Ethanol-Activated Brain Protein Kinase A: Manipulations of Ca<sup>2+</sup> Distribution and Flux," *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 38, no. 3, pp. 629–640, Mar. 2014, doi: 10.1111/acer.12289.
- [202] J. Y. Kim *et al.*, "Chronic ethanol consumption inhibits glucokinase transcriptional activity by Atf3 and triggers metabolic syndrome in vivo," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 39, pp. 27065–27079, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.585653.
- [203] Y. Zhao *et al.*, "Combined impact of alcohol consumption and metabolic syndrome on liver dysfunction in an elderly Chinese population," *Diabetol Metab Syndr*, vol. 16, no. 1, p. 74, Mar. 2024, doi: 10.1186/s13098-024-01312-0.
- [204] A. Z. Fan *et al.*, "Patterns of Alcohol Consumption and the Metabolic Syndrome," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 93, no. 10, pp. 3833–3838, Oct. 2008, doi: 10.1210/jc.2007-2788.
- [205] S. K. Kim, S.-H. Hong, J.-H. Chung, and K. B. Cho, "Association Between Alcohol Consumption and Metabolic Syndrome in a Community-Based Cohort of Korean

- Adults," *Medical Science Monitor*, vol. 23, pp. 2104–2110, May 2017, doi: 10.12659/MSM.901309.
- [206] A. Alkerwi *et al.*, "Alcohol consumption and the prevalence of metabolic syndrome: A meta-analysis of observational studies," *Atherosclerosis*, vol. 204, no. 2, pp. 624–635, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.036.
- [207] E. B. Rimm, P. Williams, K. Fosher, M. Criqui, and M. J. Stampfer, "Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors," *BMJ*, vol. 319, no. 7224, pp. 1523–1528, Dec. 1999, doi: 10.1136/bmj.319.7224.1523.
- [208] C. Thamer, M. Haap, A. Fritsche, H. Haering, and M. Stumvoll, "Relationship Between Moderate Alcohol Consumption and Adiponectin and Insulin Sensitivity in a Large Heterogeneous Population," *Diabetes Care*, vol. 27, no. 5, pp. 1240–1240, May 2004, doi: 10.2337/diacare.27.5.1240.
- [209] G. Schaller *et al.*, "Alcohol Acutely Increases Vascular Reactivity together with Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetic Men," *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, vol. 118, no. 01, pp. 57–60, Oct. 2009, doi: 10.1055/s-0029-1233453.
- [210] S. Carlsson, N. Hammar, and V. Grill, "Alcohol consumption and type 2 diabetes," *Diabetologia*, vol. 48, no. 6, pp. 1051–1054, Jun. 2005, doi: 10.1007/s00125-005-1768-5.
- [211] J. Pi *et al.*, "Reactive Oxygen Species as a Signal in Glucose- Stimulated Insulin Secretion," *Diabetes*, vol. 56, no. July, pp. 1783–1791, 2007, doi: 10.2337/db06-1601.Additional.
- [212] J. M. Barcia *et al.*, "Matching Diabetes and Alcoholism: Oxidative Stress, Inflammation, and Neurogenesis Are Commonly Involved," *Mediators Inflamm*, vol. 2015, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1155/2015/624287.
- [213] J. Nebl *et al.*, "Exercise-Induced Oxidative Stress, Nitric Oxide and Plasma Amino Acid Profile in Recreational Runners with Vegetarian and Non-Vegetarian Dietary Patterns," *Nutrients*, vol. 11, no. 8, 2019, doi: 10.3390/NU11081875.
- [214] M. S. Islam and D. T. Loots, "Experimental rodent models of type 2 diabetes: A review," *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, vol. 31, no. 4, p. 249, 2009, doi: 10.1358/mf.2009.31.4.1362513.
- [215] W.-F. Yan *et al.*, "Early longitudinal changes in left ventricular function and morphology in diabetic pigs: evaluation by 3.0T magnetic resonance imaging," *Cardiovasc Diabetol*, vol. 22, no. 1, p. 6, Jan. 2023, doi: 10.1186/s12933-022-01734-y.
- [216] J. Arias-Díaz and J. Balibrea, "Animal models in glucose intolerance and type-2 diabetes," *Nutr Hosp*, vol. 22, no. 2, pp. 160–8, 2007.
- [217] X. Guo *et al.*, "Antioxidant and In Vivo Hypoglycemic Activities of Ethanol Extract from the Leaves of *Engelhardia roxburghiana* Wall, a Comparative Study of the Extract and Astilbin," *Foods*, vol. 12, no. 5, p. 927, Feb. 2023, doi: 10.3390/foods12050927.
- [218] A. J. Kennedy, K. L. J. Ellacott, V. L. King, and A. H. Hasty, "Mouse models of the metabolic syndrome," *Dis Model Mech*, vol. 3, no. 3–4, pp. 156–166, Mar. 2010, doi: 10.1242/dmm.003467.

- [219] S. K. Wong, K.-Y. Chin, F. H. Suhaimi, A. Fairus, and S. Ima-Nirwana, "Animal models of metabolic syndrome: a review," *Nutr Metab (Lond)*, vol. 13, no. 1, p. 65, Dec. 2016, doi: 10.1186/s12986-016-0123-9.
- [220] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman, "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue," *Nature*, vol. 372, no. 6505, pp. 425–432, Dec. 1994, doi: 10.1038/372425a0.
- [221] P. Cohen *et al.*, "Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 108, no. 8, pp. 1113–1121, Oct. 2001, doi: 10.1172/JCI13914.
- [222] R. S. Ahima *et al.*, "Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting," *Nature*, vol. 382, no. 6588, pp. 250–252, Jul. 1996, doi: 10.1038/382250a0.
- [223] P. Lindström, "β-Cell Function in Obese-Hyperglycemic Mice [ob/ob Mice]," 2010, pp. 463–477. doi: 10.1007/978-90-481-3271-3\_20.
- [224] L. Fellmann, A. R. Nascimento, E. Tibiriça, and P. Bousquet, "Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome," *Pharmacol Ther*, vol. 137, no. 3, pp. 331–340, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.11.004.
- [225] E. J. Michaud *et al.*, "A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (Ay) mutation.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 7, pp. 2562–2566, Mar. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.7.2562.
- [226] B. Stocks *et al.*, "Integrated Liver and Plasma Proteomics in Obese Mice Reveals Complex Metabolic Regulation," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 21, no. 3, p. 100207, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.mcpro.2022.100207.
- [227] A. A. Aguilera, G. H. Díaz, M. L. Barcelata, O. A. Guerrero, and R. M. O. Ros, "Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-α in rats with sucrose-induced metabolic syndrome," *J Nutr Biochem*, vol. 15, no. 6, pp. 350–357, Jun. 2004, doi: 10.1016/j.jnutbio.2003.12.008.
- [228] B. Tabakoff and P. L. Hoffman, "Animal models in alcohol research.," *Alcohol Res Health*, vol. 24, no. 2, pp. 77–84, 2000, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199281>
- [229] F. Guo, K. Zheng, R. Benedé-Ubieto, F. J. Cubero, and Y. A. Nevzorova, "The Lieber-DeCarli Diet-A Flagship Model for Experimental Alcoholic Liver Disease," *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 42, no. 10, pp. 1828–1840, Oct. 2018, doi: 10.1111/acer.13840.
- [230] A. Nuñez-delMoral *et al.*, "The Matricellular Protein Hevin Is Involved in Alcohol Use Disorder," *Biomolecules*, vol. 13, no. 2, p. 234, Jan. 2023, doi: 10.3390/biom13020234.
- [231] F. P. Varodayan *et al.*, "Chronic ethanol induces a pro-inflammatory switch in interleukin-1β regulation of GABAergic signaling in the medial prefrontal cortex of male mice," *Brain Behav Immun*, vol. 110, pp. 125–139, May 2023, doi: 10.1016/j.bbi.2023.02.020.
- [232] K. Goltseker, F. W. Hopf, and S. Barak, "Advances in behavioral animal models of alcohol use disorder," *Alcohol*, vol. 74, pp. 73–82, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.alcohol.2018.05.014.

- [233] K. Sun, M. Ren, D. Liu, C. Wang, C. Yang, and L. Yan, "Alcohol consumption and risk of metabolic syndrome: A meta-analysis of prospective studies," *Clinical Nutrition*, vol. 33, no. 4, pp. 596–602, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.clnu.2013.10.003.
- [234] M. Leger *et al.*, "Object recognition test in mice," *Nat Protoc*, vol. 8, no. 12, pp. 2531–2537, Dec. 2013, doi: 10.1038/nprot.2013.155.
- [235] A. Ennaceur and J. Delacour, "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data," *Behavioural Brain Research*, vol. 31, no. 1, pp. 47–59, Nov. 1988, doi: 10.1016/0166-4328(88)90157-X.
- [236] M. Antunes and G. Biala, "The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications," *Cogn Process*, vol. 13, no. 2, pp. 93–110, May 2012, doi: 10.1007/s10339-011-0430-z.
- [237] S. J. Cohen and R. W. Stackman Jr., "Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review," *Behavioural Brain Research*, vol. 285, pp. 105–117, May 2015, doi: 10.1016/j.bbr.2014.08.002.
- [238] I. K. Smith, T. L. Vierheller, and C. A. Thorne, "Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid).," *Anal Biochem*, vol. 175, no. 2, pp. 408–13, Dec. 1988, doi: 10.1016/0003-2697(88)90564-7.
- [239] R. A. Lawrence and R. F. Burk, "Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 71, no. 4, pp. 952–958, Aug. 1976, doi: 10.1016/0006-291X(76)90747-6.
- [240] D. J. Reed, J. R. Babson, P. W. Beatty, A. E. Brodie, W. W. Ellis, and D. W. Potter, "High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides," *Anal Biochem*, vol. 106, no. 1, pp. 55–62, Jul. 1980, doi: 10.1016/0003-2697(80)90118-9.
- [241] M. J. Richard, P. Guiraud, J. Meo, and A. Favier, "High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde—thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent," *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, vol. 577, no. 1, pp. 9–18, May 1992, doi: 10.1016/0378-4347(92)80593-F.
- [242] F. J. Romero *et al.*, "Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease.," *Environ Health Perspect*, vol. 106, no. suppl 5, pp. 1229–1234, Oct. 1998, doi: 10.1289/ehp.98106s51229.
- [243] P. K. Smith *et al.*, "Measurement of protein using bicinchoninic acid," *Anal Biochem*, vol. 150, no. 1, pp. 76–85, Oct. 1985, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- [244] K. J. Wiechelman, R. D. Braun, and J. D. Fitzpatrick, "Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation," *Anal Biochem*, vol. 175, no. 1, pp. 231–237, Nov. 1988, doi: 10.1016/0003-2697(88)90383-1.
- [245] J. C. Crabbe, R. A. Harris, and G. F. Koob, "Preclinical studies of alcohol binge drinking," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1216, no. 1, pp. 24–40, Jan. 2011, doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05895.x.

- [246] T. E. Thiele and M. Navarro, "'Drinking in the dark' (DID) procedures: A model of binge-like ethanol drinking in non-dependent mice," *Alcohol*, vol. 48, no. 3, pp. 235–241, May 2014, doi: 10.1016/j.alcohol.2013.08.005.
- [247] A. M. Maldonado-Devincci *et al.*, "Adolescent intermittent ethanol exposure induces sex-dependent divergent changes in ethanol drinking and motor activity in adulthood in C57BL/6J mice," *J Neurosci Res*, vol. 100, no. 8, pp. 1560–1572, Aug. 2022, doi: 10.1002/jnr.24814.
- [248] E. Avegno and N. Gilpin, "Inducing Alcohol Dependence in Rats Using Chronic Intermittent Exposure to Alcohol Vapor," *Bio Protoc*, vol. 9, no. 9, 2019, doi: 10.21769/BioProtoc.3222.
- [249] T. Xiao, Y. Chen, A. Boisvert, M. Cole, and A. Kimbrough, "Chronic Intermittent Ethanol Vapor Exposure Paired with Two-Bottle Choice to Model Alcohol Use Disorder," *Journal of Visualized Experiments*, no. 196, Jun. 2023, doi: 10.3791/65320.
- [250] M. A. Paiva-Santos *et al.*, "Sex differences in the acute ethanol effects on object recognition memory: influence of estrous cycle," *Behavioural Pharmacology*, vol. 33, no. 5, pp. 322–332, Aug. 2022, doi: 10.1097/FBP.0000000000000680.
- [251] G. Beaudet *et al.*, "Long-Lasting Effects of Chronic Intermittent Alcohol Exposure in Adolescent Mice on Object Recognition and Hippocampal Neuronal Activity," *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 40, no. 12, pp. 2591–2603, Dec. 2016, doi: 10.1111/acer.13256.
- [252] F. Guo, K. Zheng, R. Benedé-Ubieto, F. J. Cubero, and Y. A. Nevzorova, "The Lieber-DeCarli Diet—A Flagship Model for Experimental Alcoholic Liver Disease," *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 42, no. 10, pp. 1828–1840, Oct. 2018, doi: 10.1111/acer.13840.
- [253] A. J. Brager, C. L. Ruby, R. A. Prosser, and J. D. Glass, "Chronic Ethanol Disrupts Circadian Photoc Entrainment and Daily Locomotor Activity in the Mouse," *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 34, no. 7, pp. 1266–1273, Jul. 2010, doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01204.x.
- [254] S. Liangpunsakul, "Relationship between alcohol intake and dietary pattern: Findings from NHANES III," *World J Gastroenterol*, vol. 16, no. 32, p. 4055, 2010, doi: 10.3748/wjg.v16.i32.4055.
- [255] C. S. Lieber, "Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease.," *Alcohol Res Health*, vol. 27, no. 3, pp. 220–31, 2003.
- [256] X. Wei *et al.*, "Chronic Alcohol Exposure Disturbs Lipid Homeostasis at the Adipose Tissue-Liver Axis in Mice: Analysis of Triacylglycerols Using High-Resolution Mass Spectrometry in Combination with In Vivo Metabolite Deuterium Labeling," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e55382, Feb. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0055382.
- [257] M. Tong, J. L. Ziplow, P. Mark, and S. M. de la Monte, "Dietary Soy Prevents Alcohol-Mediated Neurocognitive Dysfunction and Associated Impairments in Brain Insulin Pathway Signaling in an Adolescent Rat Model," *Biomolecules*, vol. 12, no. 5, p. 676, May 2022, doi: 10.3390/biom12050676.
- [258] K. Rasineni, P. G. Thomes, J. L. Kubik, E. N. Harris, K. K. Kharbanda, and C. A. Casey, "Chronic alcohol exposure alters circulating insulin and ghrelin levels: role of ghrelin in hepatic steatosis," *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 316, no. 4, pp. G453–G461, Apr. 2019, doi: 10.1152/ajpgi.00334.2018.

- [259] W. S. Rasband, "ImageJ," 2018, *U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*: <https://imagej.net/ij/>.
- [260] A. Tiengo, A. Valerio, M. Molinari, A. Meneghel, and A. Lapolla, "Effect of Ethanol, Acetaldehyde, and Acetate on Insulin and Glucagon Secretion in the Perfused Rat Pancreas," *Diabetes*, vol. 30, no. 9, pp. 705–709, Sep. 1981, doi: 10.2337/diab.30.9.705.
- [261] D. E. H. Flanagan *et al.*, "Alcohol consumption alters insulin secretion and cardiac autonomic activity," *Eur J Clin Invest*, vol. 32, no. 3, pp. 187–192, Mar. 2002, doi: 10.1046/j.1365-2362.2002.00970.x.
- [262] A. van de Wiel, "Diabetes mellitus and alcohol," *Diabetes Metab Res Rev*, vol. 20, no. 4, pp. 263–267, Jul. 2004, doi: 10.1002/dmrr.492.
- [263] L. Monnier, C. Colette, G. J. Dunseath, and D. R. Owens, "The Loss of Postprandial Glycemic Control Precedes Stepwise Deterioration of Fasting With Worsening Diabetes," *Diabetes Care*, vol. 30, no. 2, pp. 263–269, Feb. 2007, doi: 10.2337/dc06-1612.
- [264] M. Gulliford and O. Ukoumunne, "Determinants of glycated haemoglobin in the general population: associations with diet, alcohol and cigarette smoking," *Eur J Clin Nutr*, vol. 55, no. 7, pp. 615–623, Jul. 2001, doi: 10.1038/sj.ejcn.1601233.
- [265] A.-H. Harding *et al.*, "Cross-sectional association between total level and type of alcohol consumption and glycosylated haemoglobin level: the EPIC-Norfolk Study," *Eur J Clin Nutr*, vol. 56, no. 9, pp. 882–890, Sep. 2002, doi: 10.1038/sj.ejcn.1601408.
- [266] I. C. Schrieks, A. L. J. Heil, H. F. J. Hendriks, K. J. Mukamal, and J. W. J. Beulens, "The Effect of Alcohol Consumption on Insulin Sensitivity and Glycemic Status: A Systematic Review and Meta-analysis of Intervention Studies," *Diabetes Care*, vol. 38, no. 4, pp. 723–732, Apr. 2015, doi: 10.2337/dc14-1556.
- [267] M. Pascual, P. Baliño, C. M. G. Aragón, and C. Guerri, "Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: Role of TLR4 and TLR2," *Neuropharmacology*, vol. 89, pp. 352–359, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.014.
- [268] S. Johnsen-Soriano *et al.*, "Ebselen Prevents Chronic Alcohol-Induced Rat Hippocampal Stress and Functional Impairment," *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 31, no. 3, pp. 486–492, Mar. 2007, doi: 10.1111/j.1530-0277.2006.00329.x.
- [269] J. A. King, B. C. Nephew, A. Choudhury, G. L. Poirier, A. Lim, and P. Mandrekar, "Chronic alcohol-induced liver injury correlates with memory deficits: Role for neuroinflammation," *Alcohol*, vol. 83, pp. 75–81, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.alcohol.2019.07.005.
- [270] P. Baliño, R. Romero-Cano, J. V. Sánchez-Andrés, V. Valls, C. G. Aragón, and M. Muriach, "Effects of Acute Ethanol Administration on Brain Oxidative Status: The Role of Acetaldehyde," *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 43, no. 8, pp. 1672–1681, Aug. 2019, doi: 10.1111/acer.14133.
- [271] H. Wefers and H. Sies, "Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen.," *Eur J Biochem*, vol. 137, no. 1–2,



pp. 29–36, Dec. 1983, Accessed: Nov. 26, 2018. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6317388>

- [272] M. Somnavilla *et al.*, “The effects of acute ethanol exposure and ageing on rat brain glutathione metabolism,” *Free Radic Res*, vol. 46, no. 9, pp. 1076–1081, Sep. 2012, doi: 10.3109/10715762.2012.688963.
- [273] D. A. Dickinson and H. J. Forman, “Cellular glutathione and thiols metabolism,” *Biochem Pharmacol*, vol. 64, no. 5–6, pp. 1019–1026, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0006-2952(02)01172-3.
- [274] A. Satriano *et al.*, “Glutathione Blood Concentrations: A Biomarker of Oxidative Damage Protection during Cardiopulmonary Bypass in Children,” *Diagnostics*, vol. 9, no. 3, p. 118, Sep. 2019, doi: 10.3390/diagnostics9030118.
- [275] V. Sánchez-Vallejo *et al.*, “Alterations in glutamate cysteine ligase content in the retina of two retinitis pigmentosa animal models,” *Free Radic Biol Med*, vol. 96, pp. 245–254, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.195.
- [276] A. Meister, “Glutathione metabolism and its selective modification.,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, no. 33, pp. 17205–17208, Nov. 1988, doi: 10.1016/S0021-9258(19)77815-6.
- [277] L. Wlodek and H. Rommelspacher, “Ethanol-induced changes in the content of thiol compounds and of lipid peroxidation in livers and brains from mice: Protection by thiazolidine derivatives,” *Alcohol and Alcoholism*, Nov. 1994, doi: 10.1093/oxfordjournals.alcalc.a045599.
- [278] H. Sies and E. Cadenas, “Oxidative stress: damage to intact cells and organs.,” *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 311, no. 1152, pp. 617–631, Dec. 1985, Accessed: Oct. 18, 2018. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2869521>