

# **TRABAJO DE FINAL DE GRADO DE MEDICINA**

**Efecto del consumo de etanol sobre el sistema nervioso central en un modelo animal de síndrome metabólico**



**AUTORA: LAURA DIAB CASARES.**

**DIRECTOR: MARÍA MURIACH SAURÍ.**

**UNIDAD PREDEPARTAMENTAL DE MEDICINA-AREA DE FISIOLÓGIA.**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT. ....</b>	<b>6</b>
<b>EXTENDED SUMMARY.....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO. ....</b>	<b>15</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>15</b>
Objetivo general: .....	15
Objetivos específicos: .....	16
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Reactivos.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Equipos. ....</b>	<b>16</b>
-Cromatógrafo líquido de alta presión (Agilent Technologies, Santa Clara, California ): .....	16
-Espectrofotómetro: .....	16
- Centrífugas: .....	17
- Balanzas:.....	17
<b>3. Diseño del modelo experimental. ....</b>	<b>17</b>
Test de tolerancia a la glucosa.....	19
Determinación de la glucemia .....	19
Determinación de la concentración de insulina .....	19
Test de Reconocimiento de objetos .....	19
<b>4. Análisis estadístico. ....</b>	<b>20</b>
<b>RESULTADOS. ....</b>	<b>21</b>
<b>Determinación del peso. ....</b>	<b>21</b>
<b>Evaluación de la glucemia.....</b>	<b>22</b>
<b>Evaluación de la respuesta conductual. ....</b>	<b>25</b>
<b>DISCUSIÓN. ....</b>	<b>26</b>
Alteraciones del metabolismo de la glucosa. ....	27
Valoración del índice de discriminación (ID) corto- largo. ....	30
<b>CONCLUSIONES. ....</b>	<b>31</b>
<b>LIMITACIONES. ....</b>	<b>31</b>
<b>FORTALEZAS DEL ESTUDIO.....</b>	<b>32</b>
<b>LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS. ....</b>	<b>32</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA. ....</b>	<b>34</b>



UNIVERSITAT  
JAUME·I

## TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG) - MEDICINA

EL/LA PROFESOR/A TUTOR/A hace constar su **AUTORIZACIÓN** para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y **CERTIFICA** que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

**TÍTULO del TFG: Efecto del consumo de etanol sobre el sistema nervioso central en un modelo animal de síndrome metabólico.**

**ALUMNO/A: LAURA DIAB CASARES.**

**DNI: 29202136-W**

**PROFESOR/A TUTOR/A: MARÍA MURIACH SAURÍ.**

Fdo (Tutor/a): .....

**COTUTOR/A INTERNO/A (Sólo en casos en que el/la Tutor/a no sea profesor/a de la Titulación de Medicina):**

Fdo (CoTutor/a interno): .....

## **ABREVIATURAS.**

4-HNE: 4-HIDROXI-NONEAL.

AC: ADENILATOCICLASA.

ADIPO R1 : RECEPTOR DE LA ADIPONECTINA PLASMÁTICA.

ADP: ADENOSÍN DIFOSFATO.

AG: ÁCIDOS GRASOS.

AKT (PKB): PROETÍNA QUINASA B.

AKT 1: SERINA-TREONINA QUINASA 1.

ATP: ADENOSÍN TRIFOSFATO.

BDNF: NEUROTROFINAS.

Ca<sup>2+</sup>: CALCIO.

cAMP: ADENOSIN MONOFOSFATO CÍCLICO.

CNS: SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

CREB: ELEMENTO DE UNIÓN DE RESPUESTA A c-AMPT.

DM2: DIABETES MELLITUS TIPO 2.

DNA: ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO.

ECV: ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.

EtOH: ETANOL.

GLUT1: GLUCOSE TRANSPORTER 1

GPx: GLUTATIÓN PEROXIDASA.

GSH: GLUTATIÓN REDUCIDO.

GSSG: GLUTATIÓN OXIDADO.

HDL: COLESTEROL DE ELEVADA DENSIDAD.

ID: ÍNDICE DE DISCRIMINACIÓN.

IDF: FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE LA DIABETES.

IL-6: INTERLEUCINA 6.

LTP: POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO.

MDA: MALONDIALDHEÍDO.

mTOR: OBJETIVO MAMÍFERO DE LA RAPAMICINA.

NFkB: FACTOR NUCLEAR KAPPA.

Ob/Ob: OBESOS.

OMS (WHO): ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.

*p*: SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA.

PA: PRESIÓN ARTERIAL.

PAI-I: INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO.

PI3K: FOSFOINOSITIDA 3 QUINASA.

PKA: PROTEÍNA QUINASA A.

RCV: RIESGO CARDIOVASCULAR.

RL: RADICALES LIBRES.

ROS (ERO): ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

SGZ: ZONA SUBGRANULAR.

SM: SÍNDROME METABÓLICO.

SVZ: ZONA SUBVENTRICULAR.

TG: TRIGLICÉRIDOS.

TNF-ALFA: TUMOR NECROSIS FACTOR ALFA.

## RESUMEN.

**Introducción:** El síndrome metabólico (SM) es un cuadro clínico que presenta diversos factores de riesgo que hacen que sea la antesala de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Por otro lado, se ha postulado que el abuso en el consumo de etanol podría inducir alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Tanto el SM, como la DM2 o el consumo de etanol producen alteraciones a nivel del sistema nervioso central (SNC). El presente trabajo pretende estudiar los efectos que el consumo crónico de etanol produce sobre el SNC de ratones con SM. **Métodos:** Se usaron ratones *C57BL/6* y ratones *Ob/Ob* macho a los que se les sometió a un modelo de consumo forzado de etanol al 10% durante 6 semanas. Se analizaron pesos, glucemias, insulinemia y se realizó una sobrecarga de glucosa previa al sacrificio. Para evaluar los efectos del etanol a nivel cognitivo, se realizó un test de reconocimiento de objetos. **Resultados:** No se observaron alteraciones en la conducta entre los distintos grupos de estudio. Sin embargo los ratones obesos presentaron peso y glucemias elevadas, así como hiperinsulinemia y respuesta alteraciones en la respuesta a la sobrecarga de glucosa. El consumo de etanol en estos animales corrigió las glucemias y respuesta a la sobrecarga de glucosa, sin que afectara al peso e insulinemia. **Conclusión:** Tras 6 semanas de consumo de etanol no se modificó la conducta pero sí mejora la resistencia insulínica.

**Palabras clave:** SM, DM, etanol, resistencia insulina, conducta.

## ABSTRACT.

**Introduction:** The metabolic syndrome (MS) is a clinical condition that presents several risk factors that make it the prelude to Diabetes Mellitus type 2 (DM2). Ethanol abuse induces alterations in the metabolism of glucose and fatty acids. On the other hand, MS, DM2 and ethanol consumption, produce alterations at a central nervous system level (CNS). Therefore, the present work aims to study the behavioural and biochemical effects of chronic ethanol consumption at a central level in MS mice. **Methods:** *C57BL/6* mice were used as a control, and male *Ob/Ob* mice were used as a MS model. They were subjected to an ethanol consumption model (10% v/v) for 6 weeks. Weights, glycemia, insulinemia were analyzed and glucose overload was performed prior to sacrifice. To evaluate the effects of ethanol at the cognitive level, a short-, long-term memory behavioral paradigm was used. **Results:** No alterations in behaviour were observed between the different study groups. The MS mice showed high weight, elevated glycemia, hyperinsulinemia and alterations in the response to glucose overload. Ethanol consumption in MS animals decreased glycemic levels and the response to glucose overload, without affecting the weight and insulinemia.

**Conclusion:** After 6 weeks of ethanol consumption, no cognitive damage in short-, long term memory was observed. MS animals showed an improvement on insulin resistance.

**Key words:** SM, DM, ethanol, insulin resistance, behaviour.

## **EXTENDED SUMMARY.**

### **INTRODUCTION.**

Diabetes mellitus type 2 (DM2) is a chronic disease that is part of the group of metabolic diseases characterized by an increase in blood glucose as a result of defects in the secretion or action or both of insulin. Diabetes presents an important global health problem, both due to its high prevalence and the complications that take place in the long term, including cardiovascular problems, but also dementias, cognitive alterations or depression. The *International Diabetes Federation* (IDF) indicated in its latest statistics of 2013 that 328 million people were affected by this disease (*Barcia et al., 2014*). Therefore, one of the most important points in this regard to prevent this disease would be to diagnose and act early in the presence of metabolic syndrome (MS) in the person, since it is the prelude to diabetes, as well as avoiding the consumption of ethanol by inducing alterations in the metabolism of glucose and fatty acids.

It should be noted that ethanol abuse is also a very important socioeconomic and health problem. Approximately, according to *World Health Organization* (WHO), 76 million people suffer from problems related to the abuse of this drug, which is associated with different pathologies such as DM2.

The relationship between ethanol consumption and DM2 remains unclear, although current evidence suggests that a mild to moderate consumption of ethanol could have a protective effect on the development of DM2.

Relating ethanol abuse, MS, DM2 with the CNS, it has been shown that the three entities have negative effects on the CNS and induce cognitive alterations that affect the quality of life patients. However, there is very little literature demonstrating the combined effects of MS together with ethanol consumption on the CNS.

Therefore, the main objective of this project is to study the effects of chronic ethanol consumption at a central level in animals with MS.

## **MATERIAL AND METHODS.**

For the development of this study, mice *C57BL/6* and mice *Ob/Ob* male carriers of a mutation in the gene of leptin (*Zhang et al., 1994; Chua et al.1996*) of four weeks of age were used. They were subjected to a forced consumption model of 10% ethanol for 6 weeks. Glucose overload was performed by injecting 2g / kg of intraperitoneal glucose in fasting to subsequently determine glycemia at 0, 30, 60 and 120 minutes. The effects of ethanol at the cognitive level were evaluated through the use of a behavioral paradigm of object recognition (*Ennaceur and Delacour, 1988; Prickaerts et al., 2002*), which measured short-term memory.

## **RESULTS.**

Regarding the results of this study, no statistically significant differences were found at the behavioural level between the study groups. In the glucose overload test, significant differences were observed between both strains in terms of blood sugar levels, the *Ob/Ob* group started from basal blood glucose levels higher than the control group. At 30 minutes a response was observed in the *Ob/Ob-EtOH* group, which corrected glycemias at similar levels of the non *Ob/Ob* lineage.

## **DISCUSSION.**

The present work aims to study the effects of chronic ethanol consumption in animals with MS. To do this, *Ob/Ob* mice with a mutation in the leptin gene were chosen as a MS models.

Our results showed that *Ob/Ob* mice presented significantly higher weights compared to wild type mice. *Ob/Ob* presented hyperinsulinemia as expected. A reduction on the glycemia baseline was observed during the six weeks in the *Ob/Ob-EtOH* group. Also, glucose overload test showed significant differences between *Ob/Ob-EtOH* and *Ob/Ob*.

In conclusion, it is suggested that the mechanism of blood glucose lowering is a consequence of an increase in insulin sensitivity due to moderate consumption of ethanol.

To study the effects of ethanol at the cognitive level, a behaviour paradigm was used to measure short- and long-term memory (*Ennaceur and Delacour,1988, Prickaerts et al.,2002*). The values obtained have not shown significant differences between all the groups of the study. Regarding this, *Pascual et al.,(2011)* have found that chronic ethanol consumption produced neuroinflammatory damage that manifested at the behavioral level. It should be noted that they followed a methodology different from ours, since the time of



administration of ethanol intake was 5 months, compared to our work, which was 6 weeks. Furthermore, it is important to highlight at this point a relationship between animal weight and locomotor activity. The correlation analysis showed significant weight effect. Thus, higher weight animals had a significant motor impairment. Being so, there is no possible to distinguish whether there is a reduction in the movement of these due to lack of recognition memory, or if this is due to their obesity, which reduces their ability to move.

## INTRODUCCIÓN.

La Diabetes mellitus 2 (DM2) es una enfermedad crónica que forma parte del grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por una hiperglicemia consecuencia de defectos en la secreción y/o acción de la insulina. La hiperglicemia de forma crónica se asocia con daños a largo plazo como disfunción y fallos de diferentes órganos, especialmente los ojos, el riñón, nervios, corazón. Asimismo, se asocia con complicaciones a nivel del sistema nervioso central (SNC) como la demencia, alteraciones cognitivas o depresión. Existen dos tipos de DM, la tipo 1 o autoinmune donde se destruyen las células beta pancreáticas y, la DM tipo 2 donde las células beta no son capaces de responder a los estímulos (*Zimmet et al.,2001;Stumvoll et al.,2005*). La célula beta pancreática es la responsable de la síntesis de la secreción de insulina (*Rorsman and Braun, 2013*), se localiza en unos acúmulos denominados islotes de Langherhans, dispersos dentro del páncreas exocrino. Al conjunto de islotes de Langherhans se le puede considerar un órgano endocrino difuso.

De acuerdo con la *International Diabetes Federation (IDF)* las últimas estadísticas de la DM2 en el 2013 indicaron que 328 millones de personas estaban afectas por esta enfermedad (*Barcia et al., 2014*). La detección de individuos de elevado riesgo de padecer DM2 no sólo es importante para la prevención de la misma, si no para reducir las complicaciones que asocia, como problemas cardiovasculares, demencias, alteraciones cognitivas o depresión. Una de las estrategias clave de prevención sería el diagnóstico temprano del síndrome metabólico (SM) que precede al desarrollo de la DM2. Según la IDF el SM se define como una obesidad central (visceral) más dos de las siguientes características: a) niveles elevados de triglicéridos (TG) ( $\geq 150$  mg/dl); b) niveles disminuidos del colesterol HDL ( $< 40$ mg/dl para hombres y  $> 50$ mg/dl para mujeres); c) una presión arterial (PA)  $\geq 130$  mmHg o  $\geq 85$  mmHg), o unos niveles de glucosa incrementados ( $> 100$ mg/dl). Según esta definición el 20-30% de la población en general presentaría un SM (*Kennedy et al.,2010*). Estos individuos presentan el doble de riesgo de tener un infarto de corazón, y aumenta por cinco el riesgo de desarrollar una DM2.

Por lo tanto, la DM2 representa un problema de salud mundial importante, tanto por su elevada prevalencia como por las consecuencias que acarrea a largo término y por ello, las estrategias de prevención que incluyen cambios en los estilos de vida son vitales. Entre ellos, uno de los factores a controlar es el consumo de etanol. Hay que destacar que el abuso del mismo también es un problema socioeconómico y sanitario muy importante. La

Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente 76 millones de personas sufren desórdenes relacionados con el abuso de esta droga, y está íntimamente asociado a determinadas patologías orgánicas afectando, al igual que la DM2, a diversos órganos y sistemas, entre ellos cerebro, hígado y páncreas.

Además, existe mucha controversia y poca literatura al respecto de la relación que existe entre el consumo de etanol y el funcionamiento pancreático. Hoy en día se sabe que el abuso del mismo es un factor perjudicial, pero existen evidencias que defienden que un consumo leve-moderado de etanol podría ejercer un efecto protector frente al desarrollo de la DM2. Aunque el mecanismo a través del que podría ejercer dicho efecto aun no se conoce, existen muchos factores que pueden explicar esta relación, incluyendo un incremento en la sensibilidad de la insulina, aumento de la concentración del colesterol HDL o ejerciendo un efecto antiinflamatorio (*Baliunas et al., 2009*). En una revisión cuantitativa dirigida por *Carlsson et al. (2005)*, se concluyó que el consumo moderado de etanol reducía el riesgo de desarrollar DM2 tanto en hombre como en mujeres. En otros meta-análisis, se ha encontrado que la relación que existe entre el etanol y el desarrollo de la DM2 sigue una curva en forma de U: consumo leve-moderado como factor protector, y el abuso, factor de riesgo (*Howard AA et al., 2004*).

Al margen de esta controversia y relacionando el abuso de etanol, la obesidad, el SM, y la DM con el SNC, se ha demostrado ampliamente que el abuso de etanol da lugar al desarrollo de demencias y alteraciones cognitivas (*Gupta & Warner, 2008; Kuzma et al., 2014; Naqvi & Morgenstern, 2015*). En el caso de la DM, tal y como se ha mencionado anteriormente, ya en 1922 se puso de manifiesto que esta enfermedad originaba disfunciones cognitivas, y desde entonces multitud de estudios, tanto en modelos animales como en humanos, han demostrado la existencia de alteraciones estructurales, electrofisiológicas y conductuales, que van acompañadas de disfunción en los procesos de neurotransmisión (*Biessels et al., 1994; Muriach et al., 2006*). Aunque la magnitud de estas alteraciones cognitivas suele ser leve o moderada, la calidad de vida de los pacientes que las padecen se ve notablemente afectada (*Sinclair et al., 2000*). Así, se ha sugerido que las características del cerebro diabético podrían encajar con un estado de envejecimiento prematuro del cerebro, que da lugar a un enlentecimiento psicomotor y flexibilidad mental reducida no atribuible a otras causas (*Biessels et al., 2002*). De hecho, no sólo la DM ya establecida, sino también el SM e incluso la obesidad, se han asociado a la aparición de alteraciones cognitivas (*Mellendijk et al., 2015; Walker & Harrison, 2015; Wang et al., 2016*).

Siguiendo en la misma línea, se ha visto que tanto la DM2 como la exposición al etanol afectan también a la neurogénesis. En concreto, dañan los procesos que tienen lugar en el hipocampo. Dicha estructura, se localiza en el lóbulo temporal, y comparte con la zona subventricular (SVZ), en especial, el área subgranular (SGZ) del giro dentado, que presentan una discreta población de células madre, las cuales se diferencian a neuronas que acaban formando parte de la capa granular de celular. Tanto el consumo de etanol como la DM2 inhiben su proliferación y favorecen la muerte celular, y como consecuencia, dañan las funciones dependientes de las nuevas células que se diferenciarían y migrarían desde el hipocampo. La disminución de la neurogénesis también se acompaña de disfunciones comportamentales en modelos animales de DM2, SM, o alcoholismo, habiéndose descrito, por ejemplo, alteraciones en la ejecución en el laberinto de agua de Morris (tarea dependiente de hipocampo) (*Muriach et al., 2006, Johnsen Soriano et al., 2007; Farr et al., 2008*). Apoyando este fenómeno, en el hipocampo de animales con SM o alcohólicos también se encuentra afectada la potenciación a largo plazo (LTP) (*Johnsen-Soriano et al., 2007; Stranahan et al., 2008*), siendo este parámetro considerado como uno de los mecanismos celulares principales que subyace al aprendizaje y la memoria. Hay que destacar que la LTP es uno de los pocos parámetros estudiado en un modelo conjunto de DM2 y consumo crónico de etanol, habiéndose descrito su mayor alteración cuando se combinan ambos factores (*Min et al., 2011*), apoyando por tanto la hipótesis de este trabajo. Por otra parte, cabe comentar que, la exposición a etanol también altera el eje hipotalámico-pituitario a través de la elevación de los niveles de glucocorticoides que conducen a una degeneración del giro dentado. Este fenómeno también tiene lugar en los pacientes diabéticos, mediado por el receptor II glucocorticoideo (*Barcia et al., 2014*).

Por otro lado, en estos últimos años muchos esfuerzos se concentran en elucidar el papel de la insulina en el cerebro dado que, aunque se sabe que las neuronas pueden captar glucosa sin necesidad de esta hormona, ya hace muchos años que se descubrieron receptores para la insulina en diferentes áreas del cerebro (*Havrankova et al., 1978*). En pocos años se han descrito funciones importantísimas de la insulina en el cerebro incluyendo la regulación de la ingesta, el peso corporal, distribución de la grasa corporal, y numerosos procesos metabólicos, tal y como se ha revisado recientemente (*Heni et al., 2015*). Tanto es así, que se ha visto que ratones knockout para el receptor de la insulina en el cerebro desarrollan obesidad, dislipidemias y resistencia a la insulina en todo el organismo, y no sólo en el cerebro (*Brüning et al., 2002*). Hay que destacar igualmente, que la insulina ejerce sus efectos no sólo en áreas de control metabólico y homeostático como pueda ser el hipotálamo, sino también en otros áreas relacionadas con procesos sensoriales y funciones cognitivas, como la corteza prefrontal o el hipocampo. De hecho, la

administración intranasal de insulina mejora funciones cognitivas como la formación de memoria, a corto y a largo plazo, tanto en individuos sanos como en pacientes que sufren DM2, o alteraciones cognitivas como el Alzheimer (*Benedict et al., 2004; Ott et al., 2012; Freiherr et al., 2013; Novak et al., 2014; Yarchoan & Arnold., 2014*).

Con respecto al etanol, a pesar de existir evidencias de que esta droga induce resistencia a la insulina, que la DM2 se empieza a reconocer clínicamente como una complicación del alcoholismo, y que ambas patologías tienen efectos negativos sobre el SNC e inducen alteraciones cognitivas, no existen estudios que demuestren los efectos combinados del SM junto con el consumo de etanol sobre el SNC. Estos estudios son especialmente relevantes dado que, como se ha mencionado anteriormente, es habitual el consumo de etanol en personas con estilos de vida sedentarios y dietas poco equilibradas con exceso de nutrientes, con alto riesgo por tanto, de padecer SM, o que ya lo han desarrollado.

En cuanto a los mecanismos que podrían subyacer a estas alteraciones, es bien conocido que la exposición a etanol se acompaña de alteraciones en el sistema redox. Al igual que la hiperglicemia, la exposición al etanol reduce los niveles de antioxidantes e incrementa la producción de radicales libres (RL) con la consecuente activación de genes sensibles a los RL. El sistema glutatión, formado por el glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y la glutatión peroxidasa (GPx) es uno de los sistemas celulares antioxidantes más importantes de nuestro organismo, debido a su capacidad para atrapar especies reactivas de oxígeno (ROS). El GSH es muy ubicuo, encontrándolo entre otros en el SNC. Se sabe que el ratio GSH/GSSG y la actividad de la GPx se reducen ante la DM2 y la exposición de etanol. Interesantemente, este decrecimiento se puede prevenir mediante un tratamiento antioxidante, indicando que tal vez los ROS podrían ser parcialmente responsables del contenido de la GSH y la actividad de la GPx (*Barcia et al., 2014*).

Asimismo, los ROS producen peroxidación lipídica. Dado que el SNC es muy rico en lípidos, como consecuencia de ésta peroxidación se producen aldehídos, como por ejemplo son el malondialdeído (MDA) y 4-hidroxi-alqueno (pej. 4-hidroxi-noneal → 4HNE). Estos productos finales pueden conducir a alteraciones en la actividad enzimática o ausencia de reconocimiento de secuencias de DNA. En este sentido, el 4-HNE inhibe a la serina-treonina quinasa 1 (Akt1) de manera competitiva que resulta en un aumento en la producción de ROS y, por tanto, de muerte celular (*Barcia et al., 2014*).

Se ha visto en recientes estudios que el consumo de etanol se asocia a una pérdida del peso y un incremento de la secreción de adiponectina. Los posibles efectos favorables del consumo de etanol en la liberación de adiponectina al plasma pueden ser muy útiles en la prevención de SM, ya que ésta participa en mejorar la sensibilidad a la insulina y la oxidación de ácidos grasos en varios tejidos (*Kim et al., 2015*). Pero no obstante, en un estudio se sugirió que si administráramos cantidades moderadas de etanol en humanos o ratones con SM, el riesgo de complicaciones era mayor en este grupo de personas que en de sanos (*Adaramoye OA et al., 2012*).

A nivel molecular, cabe destacar también que el grupo de genes CREB (elemento de unión de respuesta a c-AMP) que requieren de su fosforilación para expresarse, son factores de la transcripción y codifican neurotrofinas (como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)), que se relacionan con la supervivencia neuronal, así como también favorecen la plasticidad de las mismas. Por otra parte, cabe mencionar al factor nuclear kappa (NF- $\kappa$ B), que es un factor de la transcripción implicado en la inflamación y respuesta inmune, que se encuentra involucrado también en la neuroprotección, en la división celular, plasticidad neural, crecimiento neurítico y formación de las espinas dendríticas. *Kaltsmchmidt et al., (2006)*, han sugerido que NF- $\kappa$ B podría controlar la ruta de CREB por medio de la expresión de la proteína quinasa A (PKA)(una de las quinasas que fosforila a CREB), relacionando por tanto la actividad de ambos factores de transcripción. Sin embargo, a día de hoy no existen datos al respecto de la actividad de estos factores de transcripción en el SNC de individuos con SM que consumen etanol. Sí que se ha descrito una disminución de la concentración sérica del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en un modelo combinado de etanol y DM2 (*Jung et al., 2011*), aunque no se ha llegado a caracterizar su estado en el cerebro. Es por ello que se ha estudiado el efecto del BDNF en las funciones cognitivas de individuos con SM o DM2, habiéndose descrito una disminución de su concentración, asociada a disfunciones cognitivas en estos individuos (*Awad et al., 2004; Dinel et al., 2011; Taha et al., 2012*). Por lo tanto podría resultar relevante el estudio de la concentración de esta neurotrofina, y los factores que la modulan, en el cerebro de animales con SM que consumen etanol, en relación a la aparición de situaciones de estrés oxidativo y de alteraciones funcionales en el SNC. Hay que resaltar además, que BDNF activa los procesos de autofagia a través de la vía fosfoinosinotida 3 quinasa-proteína quinasa B- objetivo mamífero de la rapamicina (PI3K Akt-mTOR), y que esa activación autofágica disminuye la muerte celular (*Chen et al., 2013; Carloni et al., 2010; Balduini et al., 2012*). Curiosamente, la insulina también modula el metabolismo, crecimiento y supervivencia celular a través de la vía PI3K Akt (*Guo, 2014*). La autofagia es considerada un mecanismo de supervivencia al eliminar las proteínas defectuosas y así,

manteniendo la funcionalidad de orgánulos como la mitocondria o retículo endoplásmico principalmente en situaciones de estrés. Pero a pesar de ello, se ha descrito en la literatura que en determinadas situaciones patológicas este mecanismo que en un principio es de defensa frente la muerte celular puede contribuir ella, y de hecho, se han asociado defectos en la autofagia con el desarrollo de SM y DM2 (*Singh et al., 2009; Gonzalez et al., 2011*), que también se han descrito tras el abuso de etanol (*Luo., 2014*). Cabe destacar, que se ha demostrado que el estrés oxidativo induce la sobreactivación de autofagia con el objeto de restaurar la homeostasis intracelular, pero que sin embargo si este estrés se prolonga en el tiempo, también lo hará la sobreactivación de la autofagia dando lugar a la patogénesis de diversas enfermedades, entre ellas las que son objeto de este proyecto (*Bergamini et al., 2004*).

## **DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.**

El presente trabajo se engloba dentro de un proyecto de investigación más amplio en el que se pretende caracterizar las alteraciones inducidas por el etanol en un modelo de SM en el cerebro de ratón, estudiando la posible aparición de alteraciones funcionales (neurogénesis y alteraciones de la conducta), así como la posible implicación procesos celulares de autofagia, inflamación, estrés oxidativo y muerte celular. Dentro de este proyecto, la hipótesis y objetivos que se plantearon para este trabajo fueron los siguientes:

### **Hipótesis**

El consumo crónico de etanol en ratones con SM induce alteraciones bioquímicas, y funcionales en el tejido nervioso de ratones que difieren de las observadas en animales con síndrome metabólico sin consumo de etanol.

### **Objetivo general:**

Estudiar el efecto del consumo crónico de etanol sobre el tejido nervioso de ratones con SM.

### **Objetivos específicos:**

1. Caracterizar las alteraciones inducidas por el etanol en un modelo de SM en el cerebro de ratón, estudiando la posible aparición de alteraciones en el metabolismo de la glucosa.
2. Estudiar si la administración de etanol en ratones con SM induce alteraciones funcionales (estudio de conducta) en el cerebro de estos animales, que pudieran diferir de las observadas con la presencia de SM únicamente.

### **MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **1. Reactivos.**

Los reactivos para las distintas soluciones, enzimas y coenzimas, son proporcionados por Sigma-Aldrich Corporation (St Louis, MO, USA) y por Boehringer Mannheim (Alemania). El agua utilizada en las determinaciones es de grado Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

#### **2. Equipos.**

##### **-Cromatógrafo líquido de alta presión (Agilent Technologies, Santa Clara, California ):**

- Bomba cromatográfica: Agilent Technology 1100 series binary HPLC Pump.
- Degasificador Agilent Technology de fases móviles serie 1100.
- Detector de fluorescencia FLD Agilent Technology 1200 con celda de 8µL.
- Detector de Diodos (DAD) Agilent Technology 1100 series .
- Inyector Agilent Technology 1050 con loop de 100 µl.
- Ordenador IBM Windows 2000 Pro (Microsoft corporation, Redmond, WA).
- Software: HP ChemStation.

##### **-Espectrofotómetro: Lambda 25 (Perkin Elmer, Waltham, MA).**



### **- Centrifugas:**

- Centrifuga refrigerada Mikro 220R (Hettich Holding GmbH & Co. oHG, Kirchleugern, Deutschland).
- Centrifuga refrigerada Megafuge 16R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

### **- Balanzas:**

- Balanza de analítica LA611-2264 (VWR , Radnor, PA).
- Balanza PGL 6001 (ADAM Equipment, Oxford, CT).

### **- Otros equipos:**

- pHmetro pH700 (EUTECH Instruments, part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) .
- Homogeneizador: Polytron PT2500e (Kinematica AG, Luzern, Switzerland).
- Sistemas de tratamientos de agua: Milli-Q Advantage A10 de Millipore (Merk GaA, Darmstadt, Alemania).
- Baños termostáticos de temperatura regulable de Selecta modelo Tectron 3471300 (J.P. Selecta, Abrera, Barcelona).
- Placa agitadora termostaticada MB100-4A (Hangzhou Allsheng Instruments CO, China).
- Microplatereader BENCHMAK (Bio-Rad, Hercules, CA).
- Lector de placas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) .

### **3. Diseño del modelo experimental.**

El estudio se realizó en ratones *C57BL/6* y ratones *Ob/Ob* macho de 5 semanas de edad. Los ratones *Ob/Ob* son ratones *C57BL/6J* portadores de una mutación en el gen de la leptina, una hormona saciante que inhibe la conducta alimentaria e incrementa el gasto energético. Estos ratones presentan hiperfagia, convirtiéndose en animales obesos, presentando también hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e hiperlipidemia. Por lo tanto, representan un buen modelo para el estudio de la obesidad, y el SM (*Pelleymounter et al., 1995; Chua et al., 1996*). Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la

Institución, ajustándose a la ley española que regula el manejo de los animales de experimentación.

Para el desarrollo de los experimentos, los ratones se expusieron de manera crónica a una solución de etanol (10% v/v) en el agua de bebida durante 6 semanas. Con tal de habituar a los animales a esta concentración de etanol, ésta fue progresivamente incrementándose durante las dos primeras semanas ( 2%, 4%, 6%, 8% y 10% v/v, cada 3 días).

Los animales fueron sacrificados después de las evaluaciones de comportamiento por dislocación cervical.

Por tanto, los animales se dividieron en los siguientes grupos:

- 1. Control (C):** ratón *C57BL/6*, dieta control ad libitum, durante 6 semanas
- 2. Etanol:** ratón *C57BL/6*, dieta etanol ad libitum, durante 6 semanas
- 3. SM:** ratón *Ob/Ob* dieta control ad libitum, durante 6 semanas.
- 4. SM + Etanol (SM+E):** ratón *Ob/Ob* dieta etanol ad libitum durante 6 semanas.

Entre los objetivos del presente trabajo se encuentra el estudiar las posibles alteraciones funcionales del SNC mediante el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria a través de test de comportamiento (reconocimiento de objetos). El número de animales vino determinado por estos estudios de conducta, debido a la variabilidad de los resultados que se obtienen en este tipo pruebas. Así, el número de animales necesario para el estudio fue de 12 por grupo. El test de reconocimiento objetos lo realizaron también todos los animales que se incluyen en el estudio, según el procedimiento que se describe más adelante.

En todos los casos se controló el peso de los animales y se realizaron estudios de glucemia semanalmente. Además, previo al sacrificio de los animales se realizó un test de tolerancia a la glucosa, acompañado de la determinación de glucemias y concentración sérica de insulina, tal y como se describe a continuación.

### **Test de tolerancia a la glucosa**

Esta prueba se realizó el día anterior al sacrificio de los animales. La noche previa a la prueba los animales quedaron en ayunas y a la mañana siguiente los animales se pesaron y se realizó una determinación de la glucemia previa a la sobrecarga de glucosa. A continuación se inyectaron 2 g/kg de glucosa intraperitoneal y se repitieron las glucemias a los 30, 60 y 120 minutos (*Schmitz-Peiffer et al., 2007*). Las muestras de sangre se obtuvieron mediante una punción venosa en la cola. Posteriormente se sacrificaron los animales según el procedimiento anteriormente descrito.

### **Determinación de la glucemia**

La concentración de glucosa en sangre se realizó con un glucómetro ACCU-CHECK (Roche Diagnostics) a partir de muestras de sangre completas obtenidas mediante punción venosa en la cola.

### **Determinación de la concentración de insulina**

La sangre obtenida tras el sacrificio de los animales se procesó para obtener el suero mediante centrifugación, dentro de la hora y media posterior a la toma de la muestra. Los sueros se congelaron a -80 °C hasta su posterior procesado. Las concentraciones de insulina se determinaron por ensayo de microelisa usando el kit para determinación de insulina en ratón, MERCORDIA mouse insulin ELISA (Mercordia Developing Diagnostics, Suecia) (*Schmitz-Peiffer et al., 2007*).

### **Test de Reconocimiento de objetos**

La prueba de reconocimiento de objetos se realiza a corto (1 h) y a largo plazo (24 h) (*Ennaceur y Delacour, 1988; Prickaerts et al., 2002*). En este paradigma conductual, el animal se sitúa en una caja de plexiglás opaca con iluminación moderada de dimensiones 70 x 45 x 30 cm. El día anterior al test, a los ratones se les permite explorar la caja (sin objetos) durante 3 min. El día del test, la prueba se realiza en dos fases, una sesión de entrenamiento (T1) seguida de la sesión de test (T2). Los animales se colocan en el medio de la caja para T1 y se deja que exploraren durante 5 minutos dos objetos idénticos situados a ambos lados de la caja. Una vez entrenados todos los ratones se devuelven a sus jaulas durante 1 h. Para el test de memoria a corto plazo, se quita uno de los objetos conocidos

(los que el animal ha explorado en la sesión T1) y se añade un objeto nuevo (objeto desconocido). Pasada 1 h (corto plazo) o 24h (largo plazo), los ratones se reintroducen en la caja para T2 durante 5 min. La exploración del objeto se define como la orientación del hocico del animal hacia el objeto dentro de un rango de 2 cm o menos desde el objeto. Los objetos se lavan con etanol después de cada camino individual para eliminar cualquier señal olfativa. La medida básica en la prueba de reconocimiento de objetos es el índice de discriminación, calculado como  $[D.I. = (t \text{ novel} - t \text{ familiar}) / (t \text{ novel} + t \text{ familiar}) 100\%]$ .

#### **4. Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS, v24; ( SPSS Inc., Chigaco, IL) para Windows.

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 media.

Se ha realizado un Modelo Lineal General Multivariante (MLG) de medidas repetidas que proporciona un análisis de varianza cuando se toma la misma medición varias veces a cada sujeto o caso. El factor inter-sujeto en este trabajo son los 4 grupos de estudio: 1) *Control*, 2) *EtOH*, 3) *Ob/Ob*, 4) *Ob/Ob-EtOH*. El factor intra-sujeto del que se repiten las medidas es el factor tiempo. Utilizando este procedimiento de modelo lineal general, se pueden contrastar hipótesis nulas sobre los efectos tanto de los factores inter-sujetos como de los factores intra-sujetos. Asimismo puede investigar las interacciones entre los factores y también los efectos individuales de los factores.

Mediante el Modelo Lineal General de Medidas repetidas se ha analizado las glucemias basales y los pesos cada semana (6 semanas), así como la sobrecarga de glucosa cada 30 minutos durante 2 h.

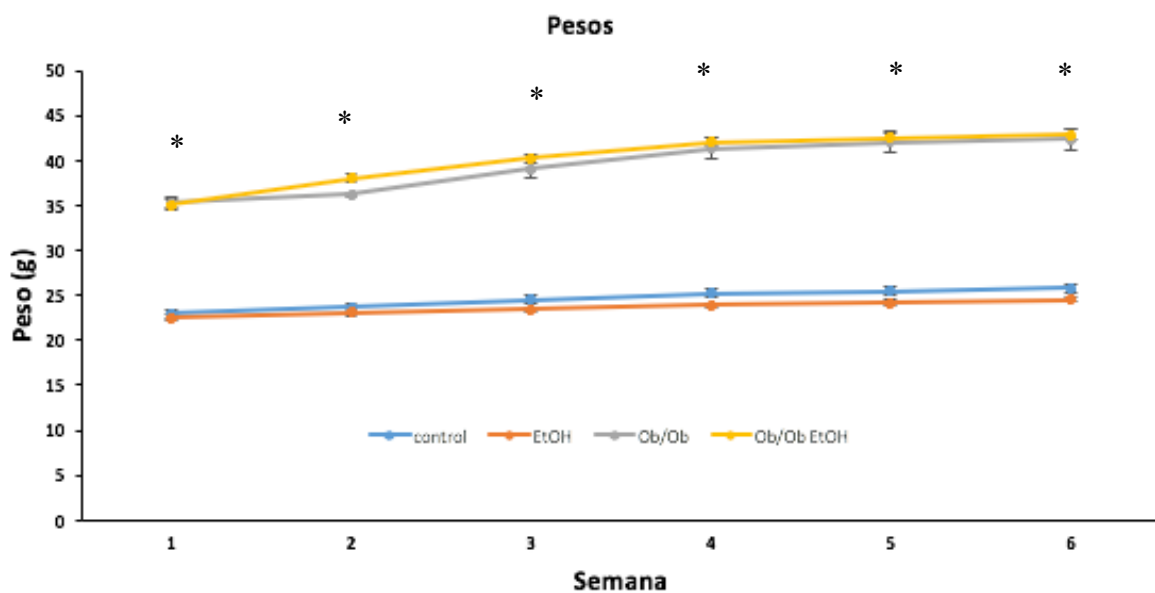
Para las determinaciones puntuales en las que el tiempo no es una variable independiente utilizamos el ANOVA de un factor. Este es el caso de la medida de la insulinemia y el análisis de la memoria a corto y largo plazo en el test de reconocimiento de objetos. Asimismo, en los casos en los que se aplicó el MLG multivariante de medidas repetidas, tras aplicar este MLG, se hizo un ANOVA de un factor para contrastar los datos obtenidos para cada semana en la glucemia y pesos, y para cada tiempo en la sobrecarga de glucosa, con el objeto de analizar en que semanas o tiempos están las diferencias. En

los casos en que se aplica este análisis y se descarta la hipótesis nula, hay que utilizar lo que se denomina un contraste post hoc a posteriori para averiguar qué grupos en concreto difieren entre ellos. En nuestro caso, la diferencia entre las medias de los distintos subgrupos se estimó mediante un contraste post hoc DMS si hay homogeneidad de varianzas o de T3 Dunnett si las varianzas no son homogéneas.

## RESULTADOS.

### Determinación del peso.

En la [figura 1](#) se representa el promedio de peso de cada grupo a lo largo del experimento. Se observa que el peso va incrementándose gradualmente semana a semana. El análisis estadístico revela, tal y como se esperaba, que los ratones con mutación para la expresión de la leptina presentan un peso significativamente superior al de los ratones *C57BL/6* control, ya desde el inicio del experimento. Esta diferencia se mantiene a lo largo de todo el experimento independientemente de si han consumido etanol o no.

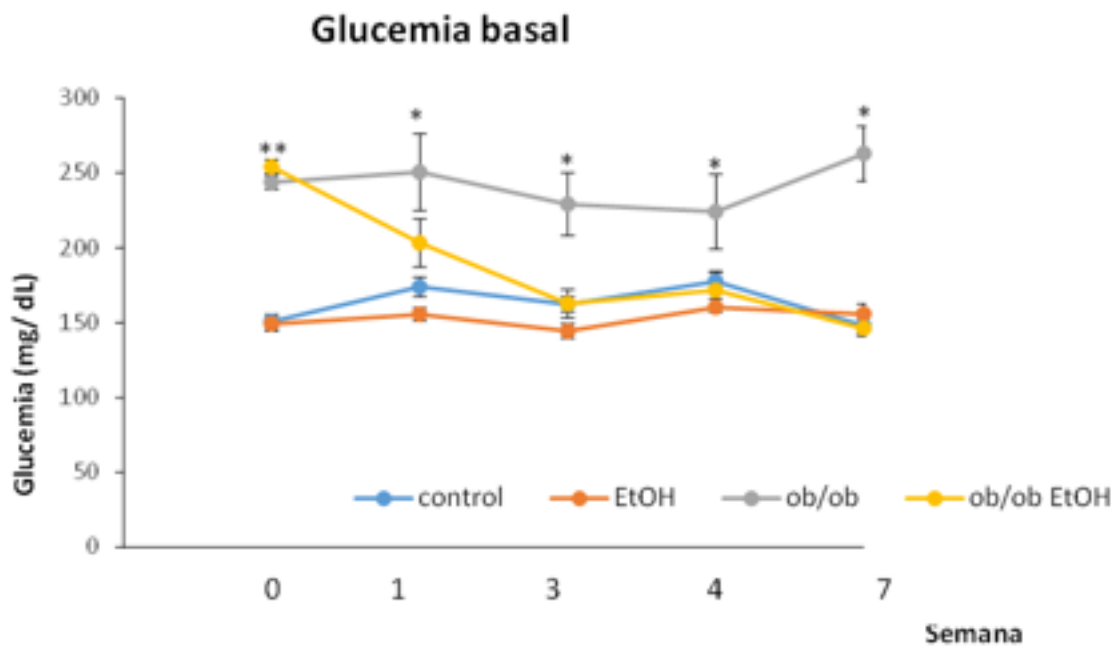


**Figura 1.** Se comparan los gramos obtenidos de los cuatros grupos cada semana.

\*  $p < 0.05$  vs Control y EtOH

## Evaluación de la glucemia.

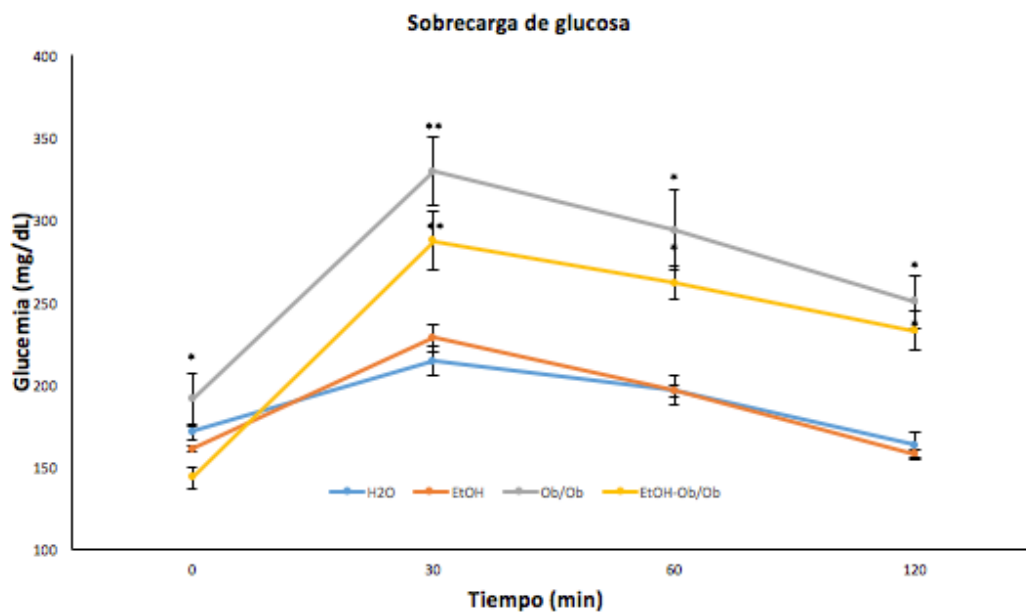
En la [figura 2](#) se comparan las glucemias basales de cada grupo semanalmente a lo largo del estudio. El MLG multivariante de medidas repetidas revela que hay diferencias inter-grupo e intra-grupo (sólo en *Ob/Ob-EtOH*). Los ratones con déficit para el receptor de la leptina presentan al inicio del experimento niveles mayores de glucemia basal respecto al grupo control. Mientras que *Ob/Ob* mantiene sus niveles elevados a lo largo de las 6 semanas, se observa que *Ob/Ob-EtOH* a partir de la primera semana empieza a corregir sus valores de glucemia hasta alcanzar glucemias basales similares al grupo de ratones no obesos. Los ratones del grupo control, con o sin ingesta de etanol, presentan niveles de glucemia basal similares a lo largo del estudio. Un dato importante a destacar en este apartado es que se considera diabético a un ratón cuando presenta una glucemia de entre 300-400 mg/dL (*Hernandorena et al.,2001*), por tanto, los ratones obesos de nuestro estudio se encuentran en un estado pre-DM, con glucemias basales aumentadas pero sin llegar a DM2.



**Figura 2.** Comparación de las glucemias basales de los cuatro grupos por semana.

\*  $p < 0.05$  vs resto de grupos, \*\*  $p < 0,05$  vs control y EtOH

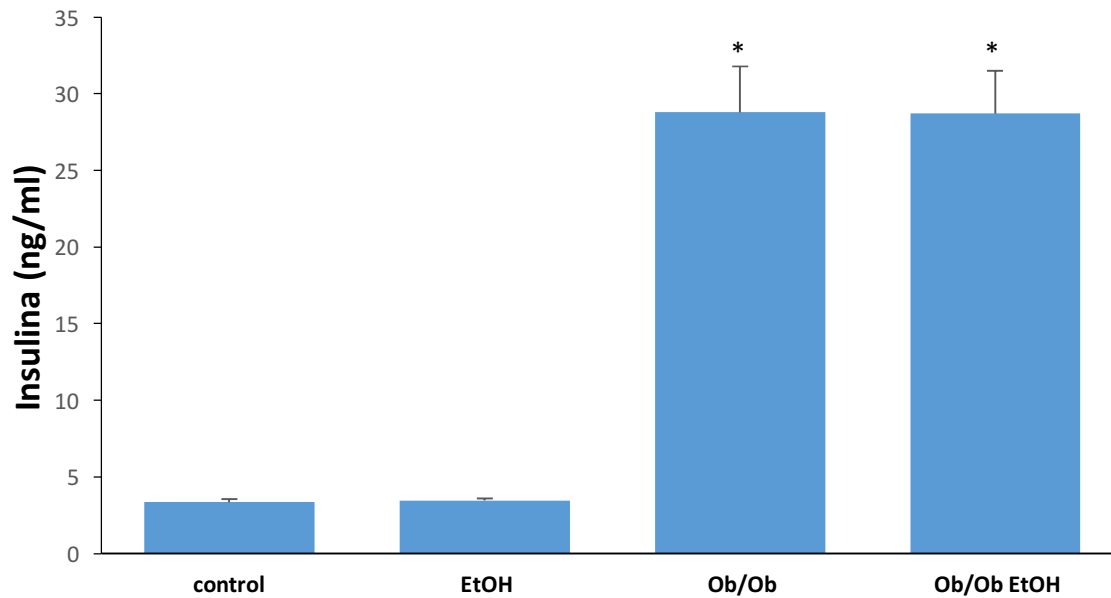
En la [figura 3](#) se muestra como varían los niveles de glucemia a lo largo de 2 h tras una sobrecarga de glucosa. Éstos se miden cada 30 minutos. Así pues, el MLG multivariante de medidas repetidas indica que hay diferencias significativas inter-grupo. Así, se observa que los *Ob/Ob* presentan una curva de valores de glicemia superior al resto de grupos de manera significativa. Los *Ob/Ob-EtOH* comparándolos con *Ob/Ob* parten de glucemias inferiores que se mantienen a lo largo de los 120 minutos del estudio. Los valores de glicemia en el grupo control se mantienen similares independientemente de la ingesta o no de etanol.



**Figura 3.** Se representan las glicemias de los cuatro grupos tras la SOG en tiempos 0, 30, 60 y 120 minutos.

\*  $p < 0.05$  vs resto de grupos, \*\*  $p < 0,05$  vs H2O y EtOH

En la figura 4 se representan las concentraciones de insulina en sangre en los cuatro grupos al finalizar el experimento. El análisis estadístico muestra que la concentración de insulina en los grupos de animales obesos es significativamente superior a la de los animales no obesos. El consumo de etanol no afectó a la insulinemia ni en animales control ni en obesos.



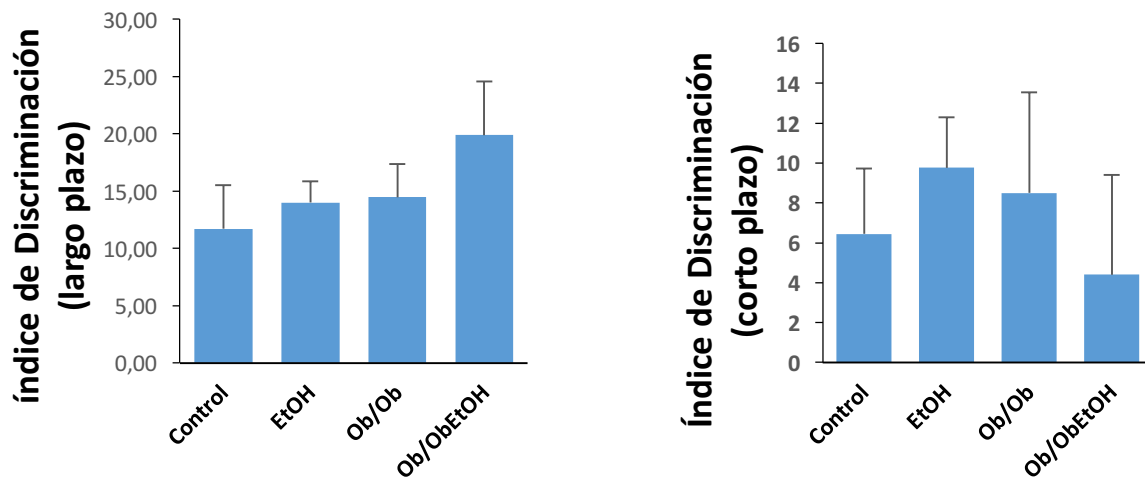
**Figura 4.** *Secreción de insulina en cada grupo.*

\*  $p < 0.05$  vs Control y EtOH



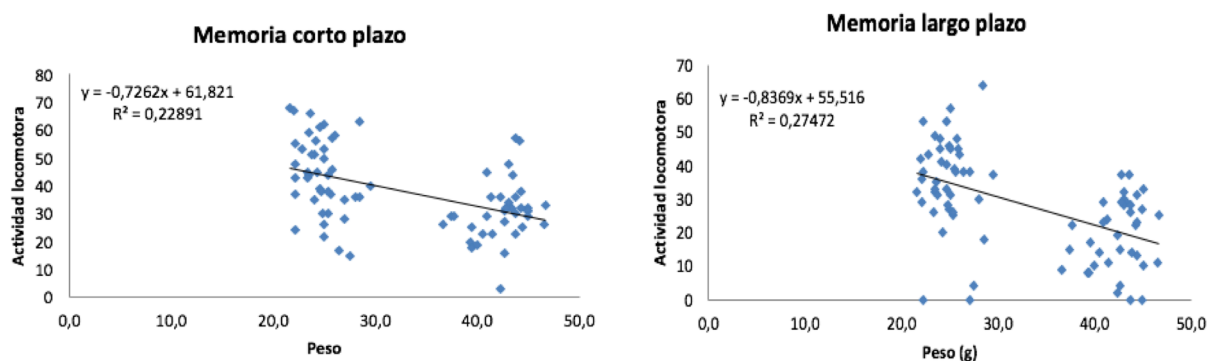
## Evaluación de la respuesta conductual.

La [figura 5](#) hace referencia al test de reconocimiento de objetos. Las posibles alteraciones de la memoria a corto (1h) y largo (24h) plazo se evaluaron utilizando este paradigma en los ratones control y obesos. El análisis ANOVA no revela diferencias significativas entre los grupos de estudio, ni a corto ni largo plazo.



**Figura 5.** Efecto de la exposición crónica al etanol en ratones control y obesos en la tarea de reconocimiento de objetos.

En [la figura 6](#), se observan dos gráficas que correlacionan la actividad locomotora (se evalúa midiendo la distancia que el animal recorre en un entorno nuevo) y el peso, mediante una regresión lineal. El análisis estadístico respalda una correlación negativa estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre estos dos parámetros.



**Figura 6.** Regresiones lineales entre el peso en gramos y la actividad locomotora.

## DISCUSIÓN.

El objetivo planteado en el siguiente trabajo trata de estudiar los efectos del consumo crónico de etanol en animales con SM. En particular, pretendemos abordar los efectos del etanol a nivel cognitivo. Este trabajo forma parte de un proyecto más amplio que pretende estudiar los efectos del consumo crónico de etanol, obesidad, SM, y DM2 en relación con el SNC. A este respecto, existe mucha controversia y no existen apenas estudios que demuestren los efectos combinados del SM junto con el consumo de etanol sobre el SNC.

La literatura actual señala que la ingesta crónica de etanol provoca un incremento de la sintasa de ácidos grasos. Este hecho favorece la obesidad abdominal, el aumento de concentración de ácidos grasos libres y un aumento de lipogénesis. Esto sugiere que el etanol aumenta el riesgo de padecer SM. Sin embargo, también hay que remarcar que existe una asociación entre el consumo de etanol y estilos de vida poco activos y con una dieta inadecuada. Por tanto, el abuso de etanol puede afectar a la incidencia de pre-DM o DM indirectamente al afectar al estilo de vida. Muchos estudios defienden una relación en forma de J o U, donde un consumo leve-moderado de etanol actuaría como factor protector, siendo capaz de aumentar tanto la sensibilidad a la insulina (*Hendriks et al. 2007*), como los niveles de HDL (*Rimm EB et al., 1999*), además de actuar como un compuesto con efectos antiinflamatorios (*Imhof A., et al 2001*). Contrariamente, el abuso de etanol actuaría como un factor de riesgo.

Hay que destacar, que la elección del modelo animal a utilizar es un parámetro crítico. Esto se debe a que se pretende conseguir la complejidad de las características DM2/SM de un humano en ratones. Para este estudio se escogieron ratones *Ob/Ob* que son animales portadores de una mutación en el gen de la leptina (*Zhang et al. 1994; Chua et al. 1996*), convirtiéndolos en animales obesos, presentando hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e hiperlipidemia (*Brüning et al., 2000*), que sería la antesala del desarrollo de la DM2.

Los datos obtenidos en este estudio apoyan la literatura actual y revelan que el etanol modifica la resistencia tisular a la insulina, tal y como se discute a continuación. Sin embargo, a pesar de que varios artículos demuestran la existencia de daño a nivel del SNC como consecuencia, entre otros, del estrés oxidativo, nuestros resultados a nivel conductual, no permiten afirmar que tras 6 semanas de consumo de etanol se observen alteraciones en la memoria a corto y/o largo plazo, como se discute mas adelante.

## **Alteraciones del metabolismo de la glucosa.**

De acuerdo con la intención del estudio, los resultados de la Figura 1 muestran que los ratones *Ob/Ob* presentan un peso estadísticamente superior al de los grupos *C57BL/6*, como respalda la literatura (*Kennedy et al., 2010*), independientemente de si consumen etanol o no.

Se ha descrito que el etanol podría incrementar la expresión de adiponectina. Así, *Imhof A. Et al., 2009* concluyeron que tras tres semanas de consumo moderado de alcohol en ratones, los niveles de adiponectina se incrementaron habiendo diferencias en función del sexo y tipo de alcohol consumido. Por otra parte, *Adaramoye OA et al.*, demostraron en un estudio con humanos que existía una asociación entre el metabolismo de la glucosa no oxidativo y los niveles del receptor de adiponectina plasmática (Adipo R1), su expresión en el músculo esquelético y la concentración de adiponectina en plasma, tanto en jóvenes como en ancianos.

Siguiendo en la misma línea, *Aldhahi W et al., 2003* aclaran el mecanismo fisiológico que explica porque el etanol presenta efectos en el metabolismo de la glucosa en relación a las concentraciones de adiponectina. Muestran que el incremento de adiponectina se relaciona con una reducción de la masa adiposa, que se traduce con menor producción de quimiocinas por parte del tejido adiposo (efecto antiinflamatorio), como son el factor de necrosis tumoral (FNT-alfa), interleuquina 6 (IL-6) y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-I), asociándose todo ello a su vez con un aumento de la sensibilidad a la insulina.

En nuestro trabajo no se ha medido la adiponectina, pero los animales *Ob/Ob-EtOH* redujeron sus niveles de glucemia basal a lo largo del experimento sin cambios en la insulinemia. Podríamos interpretar que esta reducción de la glicemia se debe a un aumento de sensibilidad de la insulina secundario a los efectos del etanol, que podría tener relación con variaciones en la expresión de adiponectina.

Asimismo, los resultados experimentales del estudio de *Sierksma A et al. (2004)*, también están de acuerdo con los datos actuales del papel de la adiponectina. Este estudio concluyó que el consumo moderado de etanol mejoró la sensibilidad a la insulina en hombres de mediana edad relativamente resistentes a la insulina, efecto que podría estar mediado por aumentos en la en la concentración de adiponectina ( el estudio se llevo a cabo durante 2 periodos de 17 días).

En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos en nuestro estudio que apoyan el aumento de sensibilidad de la insulina. La secreción de insulina entre estirpes ha sido diferente, siendo más elevada en los ratones obesos, de hecho existe una hiperinsulinemia, que coincide con la descrita en otros estudios con determinaciones en esta misma estirpe (*Dalpe-Scott et al. 1983; Bégin-Heick et al. 1979*). En nuestro caso la ingesta de etanol no ha afectado a la insulinemia. Contrariamente, en un estudio llevado a cabo por *Fromenty et al., (2009)* con ratones de la misma estirpe que los de este experimento, se observó que tras seis meses de consumo moderado de etanol, se redujeron los niveles de insulina en los ratones obesos, pero aun más en los tratados con etanol. Esto podría responder a un agotamiento de las células beta pancreáticas que no podrían sostener más tiempo la hiperinsulinemia. En nuestro trabajo, el tiempo de estudio ha sido de 6 semanas, por lo que podría no haberse llegado a observar reducción en los niveles de insulina en el grupo de ratones obesos. Probablemente si lo alargásemos si que se observaría.

Por otro lado, se sabe que la ingesta aguda de etanol es capaz de incrementar los valores intracelulares de cAMP a través de una vía dependiente de  $Ca^{2+}$  (*Baliño et al. 2015; Verkhatsky et al. 2005*) y a su vez que la vía iniciadora de la secreción de insulina en las células beta está mediada por la entrada de calcio. La proteína quinasa A (PKA) en su lugar forma parte de la vía amplificadora de secreción y su aumento está producido por un aumento de cAMP a expensas de la acción de la adenilatociclasa (AC) (*Schwede F et al., 2015*).

Centrándonos en el consumo crónico, un aumento de insulina podría ser explicado como un mecanismo de defensa del organismo ante una inhibición en la secreción basal, aunque los procesos que subyacen a este proceso son inciertos (*Kim et al. 2015*). No obstante, varios estudios han demostrado un efecto negativo del etanol sobre la función de las células beta pancreáticas. Este daño sería secundario a una desregulación de la glucoquinasa (GCK). La GCK juega un papel importante en la homeostasis glucémica ya que actúa como sensor de glucosa para la secreción de insulina glucosa-mediada y como el mayor mediador en la captación de glucosa por los hepatocitos (*Kim et al. 2007; Cullen et al. 2011*). La hiperglucemia asociada a un descenso en los niveles de GCK conlleva un aumento en la producción de ERO (*Kim et al. 2005*). El aumento de ERO puede ser uno de los eventos más tempranos asociado con la disfunción mitocondrial, disfunción de las células beta y apoptosis (*Kim et al. 2010*).

En este sentido, es importante resaltar que la insulina regula el metabolismo mitocondrial a través de la vía de señalización de PI3K/AKT, y que la disminución de AKT

inducida por una hiperinsulinemia/resistencia a insulina afecta profundamente a la función mitocondrial de las neuronas, induciendo a su vez estrés oxidativo. Recíprocamente, la disfunción mitocondrial y el consecuente estrés oxidativo pueden generar la aparición de resistencia a la *insulina* (Anderson et al., 2009; Fisher-Wellman et al., 2012).

En este estudio se muestra una evolución de los niveles de glucemia basal en los 4 grupos durante las 6 semanas del estudio (Figura 2). En el grupo de ratones control, las diferencias no fueron significativas entre los animales que consumieron etanol y los que no, dato que coincide con un reciente meta-análisis de estudios de intervención el cual concluye que el etanol no tiene efecto en la concentración de glucosa en población no diabética (Schrieks et al. 2015).

Respecto a los grupos *Ob/Ob* y *Ob/Ob-EtOH*, se observa que parten de unos niveles de glucemia basal aumentados, como los encontrados en la bibliografía (De Grot T et al., 2017.; Tahara A et al.2018.). Esta característica forma parte del descrito SM, definido por una obesidad central asociada a una resistencia insulínica (Kennedy et al., 2010). Sin embargo, el grupo *Ob/Ob-EtOH* presenta un descenso significativo de la glucemia basal a lo largo de las 7 semanas respecto al *Ob/Ob*, corrigiendo niveles hasta alcanzar valores similares a los hallados en la estirpe no obesa a partir de la tercera semana. Estos hallazgos junto con los datos encontrados en los valores de insulina, de nuevo, inducen a pensar que el mecanismo de descenso de glucosa en sangre es debido a un aumento de la sensibilidad de la insulina por parte del consumo moderado de etanol. Dicha relación queda respaldada por la literatura (O.Baliunas et al.,; Nogueira LC et al.,2017).

En cuanto al test de sobrecarga de glucosa (Figura 3), los criterios que valoran la anormalidad de este tipo de prueba se basan en el pico de glucosa alcanzado entre los 30-60 minutos y la falta de retorno de la glucemia a valores de normalidad pasadas las primeras dos horas tras la ingestión. Nuestros resultados (Figura 3) revelan en los grupos *control*, *EtOH* y *Ob/Ob* una curva similar a la reportada en estudios con machos *wistar* diabéticos (Orozco-Tapia 2008; Bhandari et al. 2008; Redd et al. 2003). La concentración a los treinta minutos también es concordante con los datos hallados en la literatura (Bhandari et al. 2008; Fernandez-Twinn et al.2005). Sin embargo, en el grupo *Ob/Ob-EtOH* observamos una disminución significativa en los valores de glucemia con respecto a al grupo *Ob/Ob*. Esto corroboraría los datos obtenidos en las glucemias basales, indicando en conjunto una disminución de la resistencia a la insulina en los animales obesos que consumen etanol en relación a los que no lo consumen. Otros grupos han obtenido resultados similares en

hombres de una comunidad japonesa (independientemente del IMC) (*Kawamoto et al. 2009; Fueki et al. 2007*)

### **Valoración del índice de discriminación (ID) corto- largo.**

Con tal de estudiar los efectos del etanol a nivel cognitivo, en concreto, memoria a corto-largo plazo, en animales con síndrome metabólico se usó un paradigma conductual de reconocimiento de objetos (*Ennaceur y Delacour, 1988; Prickaerts et al., 2002*). Mediante este test somos capaces de estudiar la memoria a corto y largo plazo registrando la capacidad del animal de acordarse del objeto familiar y solamente explorar el nuevo objeto.

Los valores obtenidos en este estudio no han mostrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio tanto a corto como a largo plazo. A este respecto, *Pascual et al., (2011)* han demostrado que el consumo crónico de etanol en animales de la misma estirpe induce un daño neuroinflamatorio que resulta en daño cognitivo. Esto se produce como consecuencia de una activación de la astrogliosis y microglia secundaria al estrés oxidativo inducido por la ingesta de etanol provocando la liberación de moléculas pro-inflamatorias que dañarían el SNC. Los animales manifestaron déficits en los procesos de memoria a corto-largo plazo, apoyando que la estructura dañada es el hipocampo y el córtex prefrontal, de acuerdo con *Broadbent et al., (2004)*. A nivel celular, existe evidencia científica que demuestra que el estrés oxidativo induce una sobreactivación de la autofagia con el objeto de restaurar la homeostasis intracelular. Sin embargo, si la situación de estrés no se resuelve, la sobreactivación prolongada de la autofagia se asocia a la patogénesis de diversas enfermedades, entre ellas las que son objeto de estudio en este proyecto (*Bergamini et al., 2004*). Siguiendo en la misma línea, a nivel molecular el daño cognitivo se ha relacionado con una reducción de la fosforilación de CREB inducida por el etanol, y ello se acompaña de reducciones en la expresión génica de BDNF que contribuyen a la neurotoxicidad hipocampal (*Zou J et al., 2006*). De hecho, el BDNF hipocampal también está disminuido en los animales con DM2. Esto se asocia con un deterioro de la memoria dependiente del hipocampo (*Winocur G et al., 2005*). Otro estudio llevado a cabo por *Zhen YF et al., (2013)* en humanos con DM2 también mostró el papel del BDNF en relación a la neuroplasticidad hipocampal, y concluyeron de manera significativa que su reducción se asociaba en la fisiopatología de déficits cognitivos.

Las discrepancias observadas en nuestros resultados en relación a los presentados por *Pascual et al.,(2011)*, pueden deberse a diferencias críticas a nivel metodológico, en concreto en la duración del estudio, ya que el tiempo de administración de etanol fue de 5

meses, mientras que en nuestro trabajo tan solo fueron 6 semanas. Por otro lado, uno de los componentes fundamentales en nuestro paradigma conductual, es el sistema motor de los ratones. Comparando nuestros resultados con los del artículo de *Pascual et al., 2011*, se observó que los ratones a los que les administró etanol presentaban una reducción de la actividad locomotora, de hecho en la figura 6 de nuestro estudio, se objetiva la existencia de una correlación significativa entre un peso elevado y una reducción de la actividad locomotora en la ejecución el test conductual. Por lo tanto, no se puede distinguir si la falta de memoria se debe a una reducción del movimiento de estos debido a su obesidad. Dado lo anterior, no se puede concluir que realmente no hayan diferencias entre los grupos de estudio, ya que el factor actividad motora que requiere el test conductual actuaría como un factor de sesgo y por tanto resultaría relevante para poder sacar conclusiones el diseñar el estudio con algún test de conducta en el que no interfiera la actividad locomotora del animal.

## **CONCLUSIONES.**

Vistos los resultados obtenidos en este estudio, podemos concluir que la ingesta de etanol en nuestros ratones obesos no ha modificado la secreción de insulina, pero sí ha mejorado la sensibilidad a la misma de manera significativa dado que, a pesar de tener valores de insulinemia elevados en relación a la estirpe no obesa, a lo largo de las 6 semanas de ingesta de etanol se alcanzaron niveles de glucemia basales similares a la de los ratones control, así como tras la sobrecarga de glucosa, mantuvieron valores de glicemia inferiores a *los Ob/Ob* a lo largo del estudio. Sin embargo, tras 6 semanas de consumo de etanol no se han podido observar alteraciones funcionales en los procesos de aprendizaje y memoria en dichos animales.

## **LIMITACIONES.**

1.- En este estudio no se han incluido valores de glucemias de todas las semanas porque algunas determinaciones dieron resultados fuera de rango con respecto al resto de valores obtenidos y no se consideraron representativos. El método en la obtención de la glucemia fue siempre el mismo, por lo que las discrepancias pudieran deberse a los distintos lotes comerciales de algunas de las tiras recomendadas para el glucómetro.

2.- No se pudo medir la alcoholemia en sangre de los animales porque el kit comercial para medir alcoholemias no dio resultados fiables y a día de hoy se está poniendo

a punto la técnica para medir alcoholemias mediante cromatografía de gases. Las muestras se encuentran congeladas y precintadas con intención de un futuro próximo obtener los datos de la alcoholemia. En cualquier caso, datos anteriores del grupo de investigación (*Pascual et al. 2011*) muestran que las alcoholemias medidas en ambos genotipos de ratones son iguales.

3.- El test de reconocimiento de objetos ha resultado no ser una prueba adecuada para valorar la memoria en ratones *Ob/Ob*, al presentar éstos una actividad locomotora disminuida, que nos ha impedido valorar adecuadamente la memoria a corto y largo plazo de estos animales.

4.- El tiempo de consumo de etanol ha supuesto un factor limitante para poder observar cambios a nivel conductual de los ratones con SM con ingesta de etanol, así como para determinar si efectivamente, existe un retraso por parte del mismo a desarrollar DM2.

#### **FORTALEZAS DEL ESTUDIO.**

La importancia de este estudio radica fundamentalmente en las patologías en las que se centra su investigación. El SM, la DM2 y el abuso de alcohol son entidades cuya prevalencia en la sociedad actual es muy alta, y no sólo eso, sino que su incidencia se encuentra en constante aumento, debido sobre todo, al estilo de vida y malos hábitos dietético-higiénicos de la población. Además, se sabe que estas tres enfermedades presentan efectos negativos sobre el SNC e inducen alteraciones cognitivas leve-moderadas, afectando a la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, no existen apenas estudios que demuestren los efectos combinados del SM junto con el consumo de alcohol sobre el SNC. Por ello, teniendo en cuenta que hay poca literatura escrita hasta el momento sobre la materia, los resultados de este estudio podrían resultar de gran interés, además de abrirnos la posibilidad a futuras estrategias terapéuticas.

#### **LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS.**

Las futuras líneas de investigación del estudio se basan principalmente en ampliar el tiempo de administración de etanol para valorar los daños a largo plazo. Se ha demostrado que en un período de seis semanas de consumo de etanol sí que se modula la resistencia a la insulina en los ratones pre-DM. Por tanto, habría que prolongar el estudio para comprobar



que efectivamente la ingestión moderada de etanol de manera crónica retrasa la aparición de DM2 en los ratones con SM. En relación a la evaluación de alteraciones cognitivas en los ratones con pre-DM, el tiempo de estudio ha sido demasiado corto como para ver manifestaciones conductuales en los mismos, y se plantea además escoger un nuevo test de conducta que evalúe mejor los procesos de memoria en animales cuya actividad locomotora está disminuida.

## BIBLIOGRAFÍA.

Adaramoye OA, Oloyede GK. Effect of moderate ethanol administration on biochemical indices in streptozotocin-diabetic Wistar rats. *West Indian Med J.*2012;61:3-9.

Agrawal R, Gomez-Pinilla F. 'Metabolic syndrome' in the brain: deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. *J Physiol.* 2012;590:2485-2499.

Aldhahi W, Hamdy O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep.* 2003;3:293-8.

Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, Neuffer . PD. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest.*2009;119:573-581.

Awad N, Gagnon M, Messier C. The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2004;26:1044-80.

Balduini W, Carloni S, Buonocore G. Autophagy in hypoxia-ischemia induced brain injury. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;1:30-34.

Baliño P, Ledesma JC, Aragon CM. Role of phosphodiesterase-4 on ethanol elicited locomotion and narcosis. *Neuropharmacology* 2015;101:271-8.

Baliunas DO, Taylor BJ, Irving H, Roerecke M, Patra J, Mohapatra S, et al. Alcohol as a risk factor for type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.* 2009;32:2123–32.

Barcia JM, Flores-Bellver M, Muriach M, et al. Matching Diabetes and Alcoholism: Oxidative Stress, Inflammation, and Neurogenesis Are Commonly Involved. *Mediators of Inflammation.* 2014;624287.

Bégin-Heick N, Houlihan PA, Sigouin J. The identification of alpha-adrenergic receptors in adipose tissue by [3H]dihydroergocryptine binding. *Can J Biochem.*1979;57:1047-9.

Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, Schultes B, Fehm HL, Born J, Kern W. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology*. 2004;29:1326-1334.

Bergamini E, Cavallini G, Donati A, Gori Z. The role of macroautophagy in the ageing process, anti-ageing intervention and age-associated diseases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004;36:2392–2404.

Bhandari U, Jain N, Pillai KK. Further studies on antioxidant potential and protection of pancreatic  $\beta$ -Cells by embelia ribes in experimental diabetes. *Experimental Diabetes Research*. *Indian J Pharmacol* 2008; 40:215-220. Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1994;37:643-650.

Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1994;37:643-650.

Biessels GJ, Vander Heide LP, Kamal A, Bley RL, GispenWH. Ageing and diabetes: implications for brain function,"*European Journal of pharmacology*.2002;441:1-14.

Broadbent, N.J., Squire, L.R., Clark, R.E.,. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2004;14515–14520.

Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2002;289:2122-2125.

Carloni S, Girelli S, Scopa C, Buonocore G, Longini M, Balduini W. Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia. *Autophagy*. 2010;6:366-377.

Carlsson S, Hammar N, Grill V. Alcohol consumption and type 2 diabetes: meta- analysis of epidemiological studies indicates a U-shaped relationship. *Diabetologia* 2005;48:1051–1054.

Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M. Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Mol Med Rep*. 2013;8:1011-1016.

Chua SC Jr, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*. 1996;16;271:994-6.

Dalpé-Scott M, Heick HM, Bégin-Heick N. Insulin secretion in the obese (ob/ob) mouse. The effect of oxytetracycline on insulin release. *Diabetes*. 1983; 32:932-7.

de Groot T, Damen L, Kosse L, Alsady M, Doty R, Baumgarten R, Sheehan S, van der Vlag J, Korstanje R, Deen PMT. Lithium reduces blood glucose levels, but aggravates albuminuria in BTBR-ob/ob mice. *PLoS One*. 2017;12:e0189485. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res*. 2012; 46:382-419.

Diabetes and Alzheimer's Disease: Impacts on Cognitive Decline. *Nutrients*. 7:7332-7357.

Dinel AL, André C, Aubert A, Ferreira G, Layé S, Castanon N. Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. *PLoS One*. 2011;6:24325.

Ennaceur, A., Delacour, J., . A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res*. 1998;31, 47–59.

Farr SA, Yamada KA, Butterfield DA, Abdul HM, Xu L, Miller NE, Banks WA, Morley JE. Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology*. 2008;149:2628-36.

Fernandez-Twinn, Wayman A, Ekizoglou S, Martin MS, Hales CN, Ozanne SE. Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-mo-old female rat offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:R368–R373.

Fisher-Wellman KH, Neuffer PD. Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. *Trends Endocrinol Metab*. 2012; 23:142-153.

Freiherr J, Hallschmid M, Frey WH 2nd, Brünner YF, Chapman CD, Hölscher C, Craft S, De Felice FG, Benedict C Intranasal insulin as a treatment for Alzheimer's disease: a review of basic research and clinical evidence. *CNS Drugs*. 2013;27:505-514

Fromenty B, Vadrot N, Massart J, Turlin B, Barri-Ova N, Lettéron P, Fautrel A, Robin MA. Chronic ethanol consumption lessens the gain of body weight, liver triglycerides, and diabetes in obese ob/ob mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331:23-34.

Fueki Y, Miida T, Wardaningsih E, Ito M, Nakamura A, Takahashi A, Hanyu O, Tsuda A, Saito H, Hama H, Okada M. Regular alcohol consumption improves insulin resistance in healthy Japanese men independent of obesity. *Clin Chim Acta*. 2007; 382:71–76.

Gonzalez CD, Lee MS, Marchetti P, Pietropaolo M, Towns R, Vaccaro MI, Watada H, Wiley JW. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy*. 2011;7:2–11.

Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol*. 2014;220:T1-T23.

Gupta S, Warner J. Alcohol-related dementia: a 21st-century silent epidemic? *Br J Psychiatry*. 2008;193:351-353.

Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 1978;272:827-829.

Hendriks HF. Moderate alcohol consumption and insulin sensitivity: observations and possible mechanisms. *Ann Epidemiol* 2007;17:S40 –S42.

Heni M, Kullmann S, Preissl H, Fritsche A, Häring HU. Impaired insulin action in the human brain: causes and metabolic consequences. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11:701-711.

Howard AA, Arnsten JH, Gourevitch MN. Effect of alcohol consumption on diabetes mellitus: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2004;140:211-9.

Imhof A, Froehlich M, Brenner H, Boeing H, Pepys MB, Koenig W. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet* 2001;357:763–767.

Hugues Hernandorena, Beatriz, César Rodríguez González, Julio, & Rodríguez García, Julio César. . Animales de laboratorio en la endocrinología: Biomodelos de la diabetes mellitus tipo 1. *Revista Cubana de Endocrinología*, 2001;12, 168-177

Imhof A, Plamper I, Maier S, Trischler G, Koenig W. Effect of Drinking on Adiponectin in Healthy Men and Women: A randomized intervention study of water, ethanol, red wine, and beer with or without alcohol. *Diabetes Care*. 2009;32:1101-1103.

J, Kim WH. Chronic ethanol consumption-induced pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis through glucokinase nitration and its down-regulation. *J Biol Chem*. 2010;285:37251-62.

Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Miranda M, Asensio S, Barcia JM, Romá J, Monfort P, Felipe V, Romero FJ. Ebselen prevents chronic alcohol-induced rat hippocampal stress and functional impairment. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31:486-492.

Jung KI, Ju A, Lee HM, Lee SS, Song CH, Won WY, Jeong JS, Hong OK, Kim JH, Kim DJ. Chronic ethanol ingestion, type 2 diabetes mellitus, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rats. *Neurosci Lett*. 2011;487:149-152.

Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, Pothion S, Arbibe L, Prüllage M, Pfeiffer J, Lindecke A, Staiger V, Israël A, Kaltschmidt C, Mémet S. NF- $\kappa$ B regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Molecular and cellular biology*. 2006;26:2936–2946.

Kawamoto R, Kohara K, Tabara Y, Miki T, Ohtsuka N, Kusunoki T, Abe M. Alcohol consumption is associated with decreased insulin resistance independent of body mass index in Japanese community-dwelling men. *Tohoku J Exp Med*. 2009; 218:331–337.

Kennedy AJ, Ellacott KLJ, King VL, Hasty AH. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech* [Internet]. 2010;3:156–66.

Kim EH, Koh EH, Park JY, Lee KU. Adenine nucleotide translocator as a regulator of mitochondrial function: implication in the pathogenesis of metabolic syndrome. *Korean Diabetes J*. 2010; 34:146-53.

Kim JY, Hwang JY, Lee DY, Song EH, Park KJ, Kim GH, et al. Chronic ethanol consumption inhibits glucokinase transcriptional activity by Atf3 and triggers metabolic syndrome in vivo. *J Biol Chem*. 2014;289:27065–79.

Kim JY. Chronic alcohol consumption potentiates the development of diabetes through pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. *World J Biol Chem* 2015;6:1.

Kim WH, Lee JW, Suh YH, Hong SH, Choi JS, Lim JH, Song JH, Gao B, Jung MH. Exposure to chronic high glucose induces betacell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic betacells. *Diabetes* 2005;54: 2602-2611.

Kim WH, Lee JW, Suh YH, Lee HJ, Lee SH, Oh YK, Gao B, Jung MH. AICAR potentiates ROS production induced by chronic high glucose: roles of AMPK in pancreatic beta-cell apoptosis. *Cell Signal*. 2007;19: 791-805

Kuzma E, Llewellyn DJ, Langa KM, Wallace RB, Lang IA History of alcohol use disorders and risk of severe cognitive impairment: a 19-year prospective cohort study. *The American Journal of Geriatric psychiatry*. 2014;22:1047-1054.

Luo J. Autophagy and ethanol neurotoxicity. *Autophagy*. 10:2099-108.

Mellendijk L, Wiesmann M, Kiliaan AJ. (2015) Impact of Nutrition on Cerebral Circulation and Cognition in the Metabolic Syndrome. *Nutrients*.2014;7:9416-9439.

Min JA, Lee HR, Kim JI, Ju A, Kim DJ, Kaang BK. Impairment of long-term potentiation in the hippocampus of alcohol-treated OLETF rats. *Neurosci Lett*. 500:52-56.

mouse. The effect of oxytetracycline on insulin release. *Diabetes*. 2011;1983: 32:932-7.

Muriach M, Bosch-Morell F, Alexander G, Blomhoff R, Barcia J, Arnal E, Almansa I, Romero FJ, Miranda M. Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med*. 2006;41:979-984.

Naqvi NH, Morgenstern J. Cognitive Neuroscience Approaches to Understanding Behavior Change in Alcohol Use Disorder Treatments. *Alcohol Res*. 2015;37:29-38.

Nogueira LC, di Rio RF, Lollo PCB, Ferreira IMPLVO. Moderate Alcoholic Beer Consumption: The Effects on the Lipid Profile and Insulin Sensitivity of Adult Men *J Food Sci.*; 2017;82:1720-1725.

Novak V, Milberg W, Hao Y, Munshi M, Novak P, Galica A, Manor B, Roberson P, Craft S, Abduljalil A. Enhancement of vasoreactivity and cognition by intranasal insulin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*.2014; 37:751-759.

Orozco-Tapia RI. Efecto de los ácidos grasos omega-3 (FA  $\omega$ -3) y linoleico conjugado (CLA) en la diabetes mellitus 2 (DM2) en ratas wistar. [Tesis]. México. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 2008.

Ott V, Benedict C, Schultes B, Born J, Hallschmid M. Intranasal administration of insulin to the brain impacts cognitive function and peripheral metabolism. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14:214-221.

Pascual M, Baliño P, Alfonso-Loeches S, Aragón CMG, Guerri C. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain Behav Immun.* 2011;25::80–91.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 1995;28;269:540-3.

Prickaerts, J., van Staveren, W.C., Sik, A., Markerink-van Ittersum, M., Niewohner, U., van der Staay, F.J., Blokland, A., de Vente, J.. Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat. *Neuroscience* 2002;113, 351–361.

Redd MG, Meszaros K, Roche E. Type 2 diabetes: gluco-lipo-toxicity and B-cell dysfunction. *Ars Pharmaceutica* 2003; 44:313-332.

Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *Br Med J* 1999;319: 1523–1528.

Rorsman P and Braun M Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. *Annu Rev Physiol* 2013;75:155-179.

Schmitz-Peiffer C, Laybutt DR, Burchfield JG, Gurisik E, Narasimhan S, Mitchell CJ, Pedersen DJ, Braun U, Cooney GJ, Leitges M, Biden TJ. Inhibition of PKCepsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance. *Cell Metab.*2007;6:320-8.

Schrieks IC, Heil AL, Hendriks HF, Mukamal KJ, Beulens JW. The effect of alcohol consumption on insulin sensitivity and glycemic status: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. *Diabetes Care.* 2015;38:723-32.



Schwede F, Chepurny OG, Kaufholz M, Bertinetti D, Leech CA, Cabrera O, Zhu Y, Mei F, Cheng X, Manning Fox JE, MacDonald PE, Genieser HG, Herberg FW, Holz GG. Rp-cAMPS Prodrugs Reveal the cAMP Dependence of First-Phase.

Sierksma A, Patel H, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Heine RJ, Grobbee DE, Kluff C, Hendriks HF. Effect of moderate alcohol consumption on adiponectin, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2004;27:184-9.

Sinclair AJ, Girling AJ, Bayer AJ. Cognitive dysfunction in older subjects with diabetes mellitus: impact on diabetes self-management and use of care services. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2000; 50:203-212.

Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009;458:1131-1135.

Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RB, Telljohann RS, Egan JM, Mattson MP. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 2008;18:1085-1088.

Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005;365:1333-1346.

Taha AY, Gao F, Ramadan E, Cheon Y, Rapoport SI, Kim HW. Upregulated expression of brain enzymatic markers of arachidonic and docosahexaenoic acid metabolism in a rat model of the metabolic syndrome. *BMC Neurosci*. 2012;13:131.

Tahara A, Takasu T. Antidiabetic effects of SGLT2 inhibitor ipragliflozin in type 2 diabetic mice fed diets containing different carbohydrate contents. *Life Sci*. 2018;197:80-90.

Tahara A, Takasu T. Antidiabetic effects of SGLT2 inhibitor ipragliflozin in type 2 diabetic mice fed diets containing different carbohydrate contents. *Life Sci*. 2018;197:80-90.

Wakabayashi KT, Kiyatkin EA. Behavior-associated and post-consumption glucose entry into the nucleus accumbens extracellular space during glucose free-drinking in trained rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2015;9:173.

Walker JM, Harrison FE. (2015) Shared Neuropathological Characteristics of Obesity, Type 2  
Wang C, Chan JS, Ren L, Yan JH. (2016) Obesity Reduces Cognitive and Motor Functions  
across the Lifespan. *Neural Plast.* 2016;2473081.

Wang C, Chan JS, Ren L, Yan JH. Obesity Reduces Cognitive and Motor Functions across  
the Lifespan. *Neural Plast.* 2016;2473081.

Wei M, Gibbons LW, Mitchell TL, Kampert JB, Blair SN. Alcohol Intake and Incidence of  
Type 2. *Diabetes Care [Internet].* 2000;23:118–22.

Winocur G, Greenwood CE, Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, Reagan LP, McEwen BS.  
Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal  
model of insulin resistance and obesity. *Behav Neurosci.* 2005;119:1389-95.

Y. F. Zhen, J. Zhang, X. Y. Liu et al., “Low BDNF is associated with cognitive deficits in  
patients with type 2 diabetes,” *Psychopharmacology*, 2013;vol. 227, no. 1, pp. 93–100.

Yarchoan M, Arnold SE. Repurposing diabetes drugs for brain insulin resistance in Alzheimer  
disease. *Diabetes.* 2014;63:2253-2261.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the  
mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; 372:425-32.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J Global and societal implications of the diabetes epidemic.  
*Nature.* 2001; 414:782-787.

Zou J, Crews F. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic  
and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26:385-405.