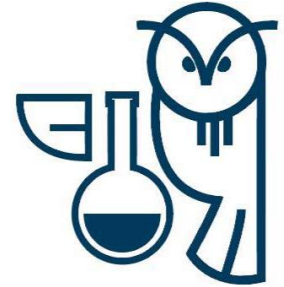




BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA**

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ETANOL SOBRE EL PROCESO INFLAMATORIO Y CITOTÓXICO EN RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO

OCTUBRE 2020

Tesis para obtener el título de
Licenciado en Farmacia

Presenta

Adrian Gutiérrez Zarate

Director de tesis

D.C. María de Guadalupe Muñoz Arenas
Departamento de Farmacia, FCQ-BUAP

Asesor

D.C. Luis Manuel de Jesús Vasquez

Comisión revisora

DR. Alfonso Daniel Diaz Fonseca
MC. José Ausencio Moran Domínguez
L.F Juan Carlos Bastida Herrera

INDICE

1. Introducción	
1.1. Síndrome metabólico	4
1.2. Alcoholismo	5
1.3. Síndrome metabólico y alcoholismo	6
1.4. Microglía	8
1.5. Organización anatómica y funcional de CA1 y NPV.....	11
1.6. Estrés oxidativo	12
1.7. receptores tipo toll (TLR) e inflamación	16
1.8. Características conductuales	17
1.8.1. Clasificación de modelos.....	17
1.8.2. Conductas	
1.8.2.1. Prueba de Campo Abierto	18
1.8.2.2. Test de suspensión de cola	18
2. Justificación	19
3. Objetivo general	20
3.1. Objetivos específicos	20
4. Metodología	
4.1. Diagrama de trabajo	21
4.2. Sujetos de experimentación	21
4.3. Control de peso	22
4.4. Administración de solución salina y etanol	22
4.5. Pruebas de conducta	
4.5.1. Campo abierto	22
4.5.2. Suspensión de cola	23
4.6. Evaluación de estrés oxidativo	24
4.7. Evaluación de proteínas totales	25
4.8. Inmunohistoquímica	26
5. Resultados	
5.1. Pruebas zoométricas	27

5.1.1	Relación de alimentación vs tiempo	27
5.1.2	Índice de masa corporal (IMC)	28
5.1.3	Peso, relación dieta y consumo de alcohol	29
5.2	Pruebas conductuales	30
5.2.1	Suspensión de cola	30
5.2.2	Campo abierto	31
5.2.3	Veces de exploración por cuadro central	33
5.3	estrés oxidativo	
5.3.1	Cerebro	34
5.3.2	Corazón	35
5.3.3	Hígado	37
5.3.4	Páncreas	39
5.4	efecto de la activación de astrocitos y por administración de etanol durante el SM	40
5.4.1	Inmunohistoquímica del área CA1	42
5.4.2	Inmunohistoquímica del área NPV	44
6	Discusión	46
7	Conclusión	58
8	Expectativas	59
9	Bibliografía	60

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de factores de riesgo. Estos factores incluyen obesidad, hiperglucemia, hipertensión, dislipidemia y resistencia a la insulina (RI), fue descrito por primera vez por Reaven como Síndrome X en 1988 (Role of insulin resistance in human disease). Desde entonces, su definición ha sufrido múltiples cambios, pero los criterios fundamentales han sido los mismos. Sin embargo, los expertos generalmente están de acuerdo en que la presencia de RI es un factor clave para entender la patogenia y hacer un diagnóstico de SM (Kanwar & Kowdley, 2015). El SM es un trastorno cada vez mayor que afecta hasta el 25% de la población en los países industrializados y que aumenta la morbimortalidad. Dadas estas proporciones, se ha convertido en una epidemia de preocupación para la salud pública. Trastornos metabólicos como la aterosclerosis, enfermedad cardiovascular (ECV), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y SM son el resultado del estilo de vida de la población actual. El SM se considera el precursor de la DM2 y es el resultado del consumo excesivo de ácidos grasos saturados y azúcares refinados (Diaz y cols, 2018).

La glucosa es el principal combustible y regulador de la función de las células β de los islotes pancreáticos. La función principal de la insulina es mantener los niveles de glucosa en la sangre en el rango normal (Hiperglucemia en ayunas: ≥ 100 mg / dL, hiperinsulinemia o DM2, Etchegoyen M. y cols, 2018). Sin embargo, esta relación homeostática se interrumpe cuando la glucosa permanece en niveles suprafisiológicos durante períodos prolongados de tiempo, una consecuencia conocida como toxicidad de la glucosa (Kawahito, S., Kitahata, H., & Oshita, S., 2009). La diabetes es uno de los trastornos metabólicos endocrinos más reconocibles que se caracteriza fundamentalmente por la hiperglucemia, es un factor patogénico bien distinguido de complicaciones crónicas en la DM y no solo genera radicales libres excesivos (especies reactivas de oxígeno [ROS]) sino que también atenúa los mecanismos de defensa antioxidantes a través de la glicación de las enzimas antioxidantes (Hum P. y cols, 2018).

El hígado desempeña un papel central en la RI relacionada con la obesidad, se refleja en la supresión deficiente de la insulina en la producción de glucosa hepática mediante la

regulación negativa de la gluconeogénesis y la inhibición de la glucogenólisis. La insulina también promueve la lipogénesis hepática de novo mediante la activación del factor 1 de transcripción (proteína de unión al elemento regulador del estero) SREBP-1c que no se reduce en los estados de RI, sino que se incrementa debido a la hiperinsulinemia compensatoria (Liu y cols, 2012). En México tan solo en el año 2018 el índice de muertes por enfermedades isquémicas del corazón fue de 108,616, por DM2 de 101,257 (INEGI). Otro panorama son los índices de obesidad con 698,461, hipertensión arterial de 520,974 y DM2 con 425,345 (secretaría de salud Epidemiología).

1.2. ALCOHOLISMO

El abuso de alcohol es una de las principales causas de enfermedad prevenible. El Informe de estado global sobre el alcohol y la salud 2014 de la Organización Mundial de la Salud indica que el abuso de alcohol representa el 50% de la cirrosis en todo el mundo (Bataller R. y Gao B., 2015). El uso nocivo del alcohol es un problema mundial. Se ha estimado que el abuso de alcohol representa el tercer factor de riesgo más grande del mundo para enfermedades y discapacidades. Es un factor causal de 60 tipos de enfermedades y lesiones y una causa concurrente de al menos otras 200 (Rocco A. y cols., 2014). El alcoholismo se define por el consumo excesivo crónico de alcohol y la dificultad para abstenerse de beber (Becker H. C., 2012). Tanto los estudios cerebrales humanos post mortem como los experimentos con animales han indicado que los cambios estructurales y funcionales anormales desempeñan funciones importantes en la patogenia del alcoholismo, aunque los mecanismos exactos que subyacen al desarrollo del alcoholismo siguen sin estar claros. La identificación de los cambios patológicos moleculares y celulares en el cerebro de los pacientes con alcoholismo contribuirá a la prevención y el tratamiento del alcoholismo, (Tomoyuki Murano, 2017).

Una característica distintiva del alcoholismo crónico es la alteración de las funciones neurofisiológicas y los estados emocionales desregulados que resultan del constante consumo del alcohol durante un extenso período de tiempo. El abuso crónico de alcohol produce cambios neuroadaptativos en los circuitos neuronales de la modulación emocional, el consumo constante de alcohol altera el tono dopaminérgico, secuestrando el sistema de recompensa natural y conduciendo a comportamientos compulsivos de búsqueda de alcohol.

Además, el consumo crónico de alcohol tiene una influencia adversa en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), lo que resulta en un cambio en la respuesta neuronal y en los estados fisiológicos basales. Dichas neuroadaptaciones se han asociado sobre todo con el deseo por el alcohol y la necesidad de consumirlo después de un período de abstinencia en personas con dependencia de alcohol (Dongju Seo, 2014)

Los trastornos por consumo de alcohol (TCA) son una enfermedad de salud mental. Muchas personas con TCA tienden a consumir altos niveles de alcohol, lo que se conoce como consumo excesivo de alcohol, por lo cual la concentración en sangre de alcohol es superior a 80 mg/dL. Sin embargo, hay estudios en seres humanos en el que sea documentado un consumo excesivo de alcohol lo que lleva alrededor de 400 mg/dL. El consumo excesivo de alcohol tiene varios efectos perjudiciales en el cerebro, lo que contribuye a la neurodegeneración, la disfunción neuronal y varias otras patologías. (Walter y cols., 2017).

El hígado es el principal órgano responsable de metabolizar el etanol. El etanol y sus productos bioactivos, el acetato de acetaldehído, los ésteres de etanol de ácidos grasos, los aductos de proteínas de etanol. El alcohol y sus metabolitos dañan directamente las células acinares y provocan células estrelladas para producir y depositar la matriz extracelular, lo que desencadena la secuencia de "necrosis-fibrosis" que finalmente conduce a la atrofia y la fibrosis, características morfológicas de la pancreatitis crónica alcohólica (Rocco A. y cols, 2014). El consumo excesivo de alcohol causa un amplio espectro de enfermedades hepáticas, que van desde la esteatosis simple hasta formas graves de daño hepático, como esteatohepatitis, fibrosis hepática, cirrosis y cáncer de hígado. Como consecuencia, la enfermedad hepática alcohólica (ALD) es una causa principal de morbilidad y mortalidad relacionadas con el hígado en todo el mundo (Bataller R. y Gao B., 2015). La enfermedad alcohólica del hígado tan solo en México en 2018 las muertes fueron de 13,948 (INEGI).

1.3. SÍNDROME METABOLICO Y ALCOHOLISMO

El alcohol es un componente único de la dieta humana. Primero, el alcohol puede considerarse como un macronutriente que proporciona 29 kJ (7 kcal) por gramo, solo superado por la grasa como fuente potencial de energía. En segundo lugar, el alcohol actúa farmacológicamente sobre el sistema nervioso. En tercer lugar, no tiene capacidad de almacenamiento, lo que significa prioridad en la oxidación en comparación con las grasas y

los carbohidratos. Todas las acciones son relevantes para los efectos sobre la ingesta de alimentos (Yeomans M.R y cols., 2003). La exposición al alcohol y la diabetes pueden asociarse con deterioro cognitivo. Además, la diabetes aumenta el riesgo de enfermedad de Alzheimer, demencia vascular y cualquier otro tipo de demencia (Barcia M. & cols., 2015). El SNC es especialmente vulnerable al daño oxidativo como resultado de su alta tasa de consumo de oxígeno, su abundante contenido de lípidos y la escasez relativa de enzimas antioxidantes en comparación con otros tejidos. El tejido neural es particularmente sensible a los ataques oxidativos; de hecho, las especies reactivas de oxígeno (ROS) están involucradas en muchas enfermedades que afectan finalmente al SNC (Dugan L. 1995). Bajo estas dos condiciones patológicas, el estrés celular desencadena daño oxidativo mitocondrial, que puede resultar en apoptosis. Está bien documentado que la diabetes y la exposición al alcohol están acompañadas por alteraciones en el estado redox. La hiperglucemia y la exposición al etanol reducen los niveles de antioxidantes y aumentan la producción de radicales libres con la activación subsiguiente de genes sensibles a la redox (Barcia M. y cols., 2015).

Sean implicado a las ROS en una amplia gama de funciones biológicas, pero pueden ser esenciales y altamente tóxicas para la homeostasis celular. Bajo condiciones normales, las ROS potencialmente tóxicas son generadas principalmente por el metabolismo respiratorio mitocondrial y son neutralizadas eficientemente por los mecanismos de defensa antioxidantes celulares. Sin embargo, se conocen varias condiciones que perturban el equilibrio entre la producción de ROS y la defensa celular, lo que resulta en la destrucción y disfunción celular. Un desequilibrio entre los factores pro y antioxidante juega un papel importante en muchos procesos de enfermedad (Kaneto H. y cols., 1996).

La enfermedad del hígado alcohólico (EHA) y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) son problemas de salud graves cuyas incidencias van en aumento. Los pacientes con EHA consumen una cantidad excesiva de alcohol, mientras que los pacientes con EHGNA suelen ser obesos; tiene resistencia a la insulina y / o síndrome metabólico. Estudios muestran que la EHGNA puede ser la manifestación hepática del síndrome metabólico. El espectro de ambas enfermedades varía desde esteatosis benigna hasta hepatitis, cirrosis y carcinoma hepatocelular. La mayoría de los pacientes con EHGNA o EHA tienen esteatosis hepática que generalmente es asintomática (Singh S. y cols., 2017).

1.4. MICROGLIA

La microglía, descrita por primera vez por Río-Hortega y caracterizada por un pequeño soma y varios procesos altamente ramificados, se derivan del linaje mielomonocítico e invaden el tejido del SNC. La microglía es el primer elemento para responder después de cualquier tipo de trastorno en el cerebro. Se someten a una transformación, también llamada activación microglial, que puede ocurrir en unas pocas horas y durar muchos días (Pocock J.M. y Kettenmann H, 2007; Karsten U. y Kettenmann H. 2007). Son las células inmunes residentes del linaje mielóide del SNC que se activan en respuesta alteraciones de la homeostasis del sistema nervioso y se conoce comúnmente como activada en función de los cambios en su morfología o expresión de antígenos de la superficie celular (Ransohoff M. R. & Perry V. H, 2009). La microglía se caracteriza a menudo por dos fenotipos activados distintos: el fenotipo proinflamatorio / activado clásico M1 y el fenotipo activado antiinflamatorio / alternativo M2. Mientras que los fenotipos M2 promueven la reparación tisular y la fagocitosis de agregados de proteínas y residuos celulares, es más probable que los fenotipos M1 sean perjudiciales para el cerebro al inducir toxicidad neuronal a través de la secreción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias y la producción de oxígeno reactivo ROS (Peng H. & cols., 2017).

Los astrocitos son jugadores activos de señalización dinámica del sistema nervioso central (SNC). En los últimos 25 años, ha quedado claro que los astrocitos participan en una variedad de procesos fisiológicos esenciales en el cerebro sano. De hecho, lejos de ser células meramente pasivas que brindan soporte estructural a las neuronas, los astrocitos ahora se consideran elementos activos y dinámicos cruciales de los circuitos cerebrales: participan en la formación y maduración de sinapsis, tráfico de receptores, control de la homeostasis de iones y metabolitos de energía y eliminación de neurotransmisores, también regulan el volumen del espacio extracelular y modulan la plasticidad sináptica momento a momento. De hecho, los astrocitos del tejido cerebral humano exhiben una "excitabilidad intrínseca" basada en Ca^{2+} y pueden responder a neurotransmisores liberados sinápticamente (Dossi E. Vasile F. y Rouach N., 2017). La microglía, su función se ha caracterizado principalmente en patologías. En condiciones patológicas, la activación de la microglía es una característica temprana común de la mayoría de las enfermedades cerebrales, que es la etapa primaria de la inflamación, seguida de alteraciones sinápticas (Pascuala O. & cols., 2011). La microglía

y mecanismos inflamatorios mediados por astrocitos en el cerebro puede tener un impacto en la neurodegeneración durante el envejecimiento y en las enfermedades neurológicas. De hecho, además de su papel de apoyo, la función de los astrocitos como jugadores activos de transmisión sináptica ahora es ampliamente aceptada. Los astrocitos expresan receptores de glutamato y, por lo tanto, responden al glutamato que se derrama de las sinapsis. Este derrame desencadena la liberación de gliotransmisores (glutamato, D-serina o ATP) que pueden modular la actividad neuronal, la transmisión sináptica y la plasticidad. Las respuestas inflamatorias mediadas por microglía incluyen la activación de proteínas del complemento (CD1, CD4), citocinas inflamatorias (IL1, IL6), factores de crecimiento específicos (factor de crecimiento nervioso (NGF)) y muchos inhibidores de proteasa (Long M. J. y cols., 1998).

En condiciones fisiológicas, las células microgliales están presentes en todas las regiones del cerebro adulto con una densidad bastante alta (Pocock J.M. & Kettenmann H, 2007). Las células microgliales son altamente dinámicas y reaccionan rápidamente a la modificación de su entorno. Expresan receptores de membrana para todos los neurotransmisores conocidos y, por lo tanto, son capaces de detectar de manera activa la actividad neuronal y / o comunicarse con los astrocitos. En respuesta a los estímulos, la microglía se activa y libera neurotransmisores (Pascuala O. & cols., 2011), la microglía activa una amplia gama de factores, algunos de los cuales pueden desencadenar activamente apoptosis en cultivos de células neuronales: glutamato o Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) con Fas Ligand (FasL) en células granulares del cerebelo, óxido nítrico (NO), e interleucina-1b (IL-1b) en cultivos mixtos de médula espinal, catepsina B en hipocampo y neuronas de gránulos cerebelosos, ROS (Bessis A. & cols., 2006).

La activación de la microglía está asociada con el cambio morfológico de un estado de reposo, caracterizado por procesos de tipo somata y ramificado más pequeños, a un estado activado en el que los somata aumentan de tamaño y tienen procesos más cortos y robustos. Los astrocitos activados inhiben la hipertrofia y la proliferación, y pueden secretar factores de crecimiento como NGF, citocinas (IL1, IL6, TNF-a y S100-b) y unidades del sistema del complemento, como CD3 y CD6 - 9. Estas respuestas inflamatorias de astrocitos y microglías a la presencia de placas centrales pueden ser parte de un circuito de retroalimentación auto

modulante y potencialmente neurotóxico en el cerebro (Long M. J. y cols., 1998). La activación microglial se caracteriza clásicamente por dos cambios importantes. Primero, la forma de la célula se transforma de una morfología ramificada y altamente ramificada a una forma ameboide, y segundo, estas células ameboides se convierten en fagocitos activos. En diferentes patologías, la microglía adquiere distintos estados funcionales y, durante la progresión de la enfermedad, las células microgliales modifican y cambian su fenotipo activado. La microglía activada interactúa específicamente con las neuronas e influye en su supervivencia, ya sea en una dirección positiva o negativa. Microglía puede contactar físicamente a las neuronas lesionadas y eliminar las sinapsis, un proceso denominado extracción sináptica; En algunos casos, se eliminan árboles dendríticos completos. Como parte de la activación, las células microgliales liberan diversas sustancias, como las especies reactivas de oxígeno, las citoquinas o los factores de crecimiento, que influyen en el proceso patológico durante la fase aguda y crónica, así como durante la regeneración posterior (Kettenmann & cols., 2013).

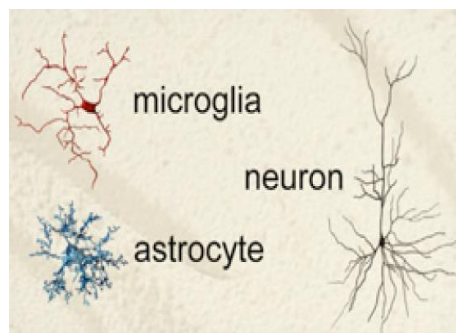


Figura. 1: En todo el sistema nervioso central, microglía (rojo) examina las redes neuronales (negro) y los sincitios astrogliales (azul). Tanto la microglía como los astrocitos dividen uniformemente la materia gris a través de un proceso llamado mosaico en el que las células microgliales individuales y los astrocitos solo se superponen de manera mínima en el espacio tridimensional. Tomada y modificada de Kettenmann & cols, 2013)

Está claro que todas las acciones del etanol dependen de la dosis y del tiempo, con diferentes mecanismos sinápticos y de circuito que predominan en diferentes dosis y tiempos, uno de los efectos primarios a la exposición aguda al etanol es inhibir las funciones cognitivas, incluido el aprendizaje y la memoria en humanos (Givens B. & cols., 2000). El hipocampo es el sitio principal donde el alcohol afecta la función cognitiva humana. La exposición aguda al etanol inhibe la potenciación a largo plazo (LTP) en la región CA1 del hipocampo *in vivo* y en cortes. Un aumento inducido por etanol en la transmisión GABAérgica se considera el mecanismo principal por el cual el etanol inhibe la LTP (Ramachandran & cols., 2014).

1.5. ORGANIZACIÓN ANATÓMICA Y FUNCIONAL DE CA1 Y NPV

Se ha logrado un progreso considerable hacia la identificación de los mecanismos moleculares que median las modificaciones sinápticas a largo plazo y dependientes de la actividad que se consideran importantes para el almacenamiento de la memoria. Sin embargo, para alterar la producción neuronal, estos cambios sinápticos deben ser leídos por las propiedades integradoras de la célula postsináptica. (Nolan M.F y cols., 2004). La formación hipocampal es una lámina curvada de corteza que está plegada en la superficie media y basal del lóbulo temporal, ocupando el piso del ventrículo lateral. La formación hipocampal consta de tres partes mayores: el giro o circunvolución dentada, el subiculum y el hipocampo propiamente dicho que desde el punto de vista fisiológico ha sido dividido en tres zonas, en sentido lateral medial Cornu Amonis (CA): CA1, CA2 y CA3 (Aguirre E. E., 2015). La dieta alta en calorías administrada durante 90 días induce cambios metabólicos que afectan el reconocimiento de la memoria, además de reducir la densidad de las espinas dendríticas y la inmunorreactividad de sinaptofisina en las áreas del hipocampo CA1, CA3 y Giro dentado (Treviño S. y cols., 2017). El hipocampo presenta muchas conexiones aferentes y eferentes dentro de la corteza cerebral. La corteza entorrinal (CE) da lugar a una proyección poderosa que constituye la entrada cortical principal al hipocampo por medio del circuito trisináptico, que involucra el giro dentado (DG) en la región CA3. Además, están involucradas las fibras Schaffer, que se comunican con las neuronas de la región CA1. Todas estas proyecciones neuronales están involucradas en el proceso de adquisición y almacenamiento de información. (Witter M.P. y cols., 1998; Treviño S. y cols. 2017).

El núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) está anatómicamente conectado a otras áreas hipotalámicas y al tronco encefálico, siendo un núcleo integrador importante para funciones autónomas y neuroendocrinas. Entre las funciones NPV se encuentran la regulación de la ingesta de alimentos, el reflejo aferente adiposo (AAR), las respuestas al estrés, la modulación de la tasa metabólica, la termorregulación, la modulación de la actividad del nervio simpático y la función cardiovascular, Swanson and Sawchenko, 1980. Las neuronas magnocelulares y parvocelulares de NPV expresan receptores para una amplia gama de neurotransmisores y neurohormonas que incluyen leptina, insulina, neuropéptido Y, Ang-II, GABA, glutamato, vasopresina, oxitocina y andorrrainrenalina, Stanley and Leibowitz, 1984. Por lo tanto, se sugiere que un desequilibrio en la función sináptica que modula la neurona

pre autónoma o neurosecretora produce disfunciones cardiovasculares y neuroendocrinas que, a su vez, contribuyen al desarrollo y potenciación de la respuesta simpaticoexcitadora observada en hipertensión, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, diabetes y obesidad (Cruz C.J y cols., 2015).

1.6. ESTRÉS OXIDATIVO

Como se describió anteriormente, el IR, la inflamación y la hiperglucemia inducen estrés oxidativo. El concepto actual de estrés oxidativo concebido por Helmut y Jones es un "desequilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes a favor de los oxidantes, lo que conduce a una interrupción de la señalización y el control redox, y / o daño molecular" (Sies H, 2017). Los radicales libres son moléculas altamente inestables y reactivas que alteran la estructura de la proteína y modifican las propiedades fisicoquímicas de las membranas, lo que resulta en orgánulos y daño celular. Esta

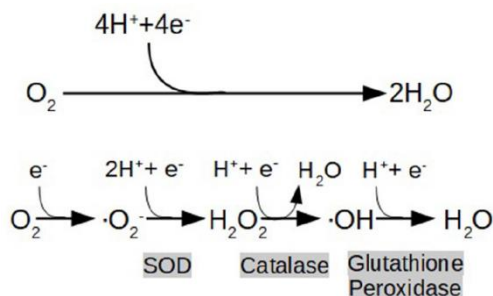


Figura. 2: Ruta metabólica final de la cadena de transporte de electrones (ETC), que muestra la reducción del oxígeno (O_2) al agua (H_2O) y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como consecuencia de su reducción parcial: O_2 (superóxido), H_2O_2 (hidrógeno peróxido), $\cdot OH$ (radical hidroxilo). En gris se muestran las enzimas que catalizan las reacciones (SOD: Superóxido Dismutase). Tomada de Etchegoyen M. y cols., 2018

reacción fundamental ocurre en el Complejo IV de la ETC durante la respiración fisiológica. Las mitocondrias no solo suministran a la célula una mayor cantidad de ATP en comparación con otras vías metabólicas, sino que también desempeñan funciones importantes en la señalización de la apoptosis, la termorregulación y otros procesos vitales. La adaptación a un estilo de vida aeróbico benefició a las células eucariotas de muchas maneras, pero también trajo complicaciones. Desafortunadamente, el entorno aeróbico genera ROS y las mitocondrias son la principal fuente celular de ROS. Los tejidos metabólicamente activos como el hígado, el corazón y el cerebro son los principales contribuyentes de ROS al cuerpo (Etchegoyen M. y cols., 2018).

Las ROS suelen reaccionar con los lípidos, un proceso conocido como peroxidación lipídica. Dado que el SNC es particularmente rico en ácidos grasos, esta peroxidación da como resultado la producción de aldehído, por ejemplo, malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenosales tales como 4-hidroxi-nonenal (4-HNE). Estos productos finales pueden

crear aductos que conducen a alteraciones y modificaciones de proteínas. Estos hechos pueden producir alteraciones de la actividad enzimática o la falta de reconocimiento de secuencia del ADN, entre otros efectos secundarios. De esta manera, el 4-HNE inhibe la Akt1 mediante la inhibición competitiva de ATP en el dominio de la quinasa de los sitios de unión de la ATP, lo que resulta en un aumento de los niveles de ROS y la muerte celular. La producción de ROS disminuyó la defensa antioxidante y aumentó la peroxidación lipídica y la degeneración de la membrana, lo que llevó a daño celular / muerte en la diabetes o exposición al etanol. De hecho, la disfunción mitocondrial y la reducción de la biosíntesis de ATP se han relacionado con la diabetes y la exposición al etanol. La acumulación de productos de peroxidación lipídica como 4-HNE y MDA en las mitocondrias también se ha informado en pacientes diabéticos, posiblemente causando un daño adicional a los sistemas genéticos y metabólicos mitocondriales (Barcia J. M., 2015)

La señalización de NO intercelular e intracelular es muy compleja, reflejando sus muchas vías e interacciones con otros radicales libres para formar moléculas de señalización adicionales. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), especialmente el radical aniónico superóxido, pueden reaccionar con el NO de forma no enzimática con una constante tasa extremadamente alta limitada solo por difusión. Estas reacciones producen peroxinitrito (ONOO-) y otras especies de oxígeno y nitrógeno altamente reactivas (ROS / RNS), que en conjunto con el NO actúan como moléculas de señalización y también representan el estrés oxidativo, nitrativo y nitrosante (Pechánová O. & cols., 2014).

El óxido nítrico (NO) es una importante molécula fisiológica mensajera y efectora en muchos sistemas biológicos, incluidos los tejidos inmunológicos, neuronales y cardiovasculares. Debido a su participación en estos diversos sistemas, el interés en medir el NO en tejidos y fluidos biológicos sigue siendo fuerte. Un medio para investigar la formación de óxido nítrico es medir el nitrito (NO₂⁻), que es uno de los dos productos primarios, estables y no volátiles de degradación del NO (Promega Corporation, 2009).

Existen tres NOS diferentes: la NOS endotelial (eNOS, NOS III), la NOS inducible (iNOS, NOS II) y la NOS neuronal (nNOS, NOS I). Los genes de las tres isoformas NOS diferentes se encuentran en cromosomas diferentes. eNOS se descubrió por primera vez en el endotelio vascular, nNOS en el cerebro e iNOS en macrófagos. Mientras que eNOS y nNOS se

expresan constitutivamente en Ca^{2+} y dependen de la calmodulina (CaM), la transcripción de iNOS es inducida por citoquinas y lipopolisacáridos (Rassaf T. y cols., 2013).

El iNOS participa en lesiones celulares y defensa del huésped. Es una de las tres isoformas que pertenecen a la familia del NOS. A diferencia de los nNOS y eNOS constitutivamente existentes, se puede detectar poco iNOS en células y tejidos normales. Su expresión es inducible y con frecuencia se asocia con inflamación y enfermedades malignas y las citoquinas, incluido el interferón- γ (IFN- γ), son potentes inductores de la expresión del gen iNOS. Todas las isoformas NOS se activan mediante su unión con el cofactor calmodulina (CaM). Sin embargo, iNOS contiene una CaM intrínsecamente unida y se mantiene constantemente activa una vez expresada. Se cree que la actividad continua junto con la alta eficacia de generación de NO se adapta a iNOS por sus funciones en la defensa del huésped y la lesión celular (Wanga T. y cols. 2018; Kielbik M. y cols., 2019). Es bien sabido que las células endoteliales juegan un papel importante en la fisiología y patología vascular. Las células endoteliales forman la barrera con permeabilidad selectiva, particularmente en el cerebro. La disfunción endotelial y las lesiones contribuyen a la patogénesis de la hipertensión, la aterosclerosis, el infarto de miocardio y la tromboembolia. En las células endoteliales vasculares, NO es un vasodilatador derivado del endotelio que contribuye al control de la presión arterial y la protección de los vasos. La eNOS endotelial se activa por el esfuerzo cortante producido por el flujo sanguíneo y por diversos agonistas, como la bradiquinina, la acetilcolina y el factor de crecimiento vascular endotelial. El NO producido por eNOS en el endotelio confiere efectos antihipertensivos, antitrombóticos y antiateroscleróticos (Xia N y cols. 2017; Xia W y cols., 2018). Las isoformas de NOS (nNOS y eNOS) se encuentran (no exclusivamente) en nervios centrales y periféricos, células vasculares y endoteliales, respectivamente, y sirven a una amplia gama de funciones ominosamente fisiológicas o de "limpieza". Se ha demostrado que el aumento NO y nNOS desempeñan funciones importantes en la generación de nocicepción aguda y sensibilización central del dolor patológico persistente, incluido el dolor neuropático e inflamatorio la memoria, el control del flujo de sangre cerebral y la neurodegeneración después de la cerebral-isquemia. En el sistema nervioso, el NO se sintetiza a partir del nitrógeno guanidino terminal de la arginina por la acción de nNOS, luego media la modulación de la plasticidad sináptica de una manera espacialmente restringida e inicia o contribuye a la muerte celular

neuronal. Además, nNOS ubicado en nervios seleccionados no adrenérgicos, no colinérgicos (NANC) en la periferia genera NO, que actúa como neurotransmisor para relajar el músculo liso en los tractos gastrointestinales y neurogenitales y las vías respiratorias (Peng J. y cols. 2017; Moore, P. K. y Handy, R. L. C., 1997). Cada isoforma NOS muestra un comportamiento catalítico distinto a pesar de la secuencia significativa y la homología de la estructura tridimensional. El dominio de la flavoenzima de NOS controla la reacción general ya que la transferencia de electrones desde las flavinas al hemo, es el paso limitante de la velocidad en la biosíntesis de NO. La expresión de cada isoforma NOS responde a diferentes señales y estresores. El NO es sintetizado por un grupo de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas, las sintasas de óxido nítrico son flavoenzimas (NADPH, FAD, FMN, tetrahydrobiopterina y hemo). La producción enzimática de NO contiene una transferencia de cinco electrones y requiere la presencia de varios sustratos y cofactores, como la L-arginina, oxígeno, tetrahydrobiopterina y reducen la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato. NO es una molécula gaseosa altamente reactiva con un electrón no apareado. NO actúa principalmente en la moda auto / paracrina y la señalización están limitadas por su rápida oxidación a nitrito y nitrato, y su rápida reacción no enzimática con superóxido para producir peroxinitrito, la mayoría de los efectos nocivos del NO están asociados con la formación de peroxinitrito, un producto de la interacción entre NO y superóxido. El NO reacciona rápidamente con la oxihemoglobina para formar metahemoglobina y nitrato. La oxidación de NO a nitrito se ve aumentada por la ceruloplasmina oxidasa multicobre, que cataliza la oxidación de NO a NO⁺, que se hidroliza rápidamente a nitrito. Los astrocitos, el tipo de célula principal en el sistema nervioso central, liberan NO en condiciones basales y tras la estimulación por trauma e insulto patológico. Una vía adicional de formación de NO es la reducción de nitrito por un grupo de enzimas llamadas reductasas de nitrito, que, en contraste con NOS, ejercen una mayor actividad bajo hipoxia. Esta fuente de NO está asociada con los efectos citoprotectores y la regulación de la hemodinámica. Sin embargo, además de las funciones fisiológicas, el NO puede ser perjudicial debido a la modificación de proteínas mediada por el NO, la inducción de neurotoxicidad, la inhibición de la respiración mitocondrial y la fragmentación de los orgánulos. Dado que las tres isoformas de NOS están activas en los astrocitos, la producción de liberación de NO en condiciones de estrés sería concebiblemente alta (Hannibal L. 2016; Dumitrescu D. S. y cols. 2016).

1.7. RECEPTORES TIPO TOLL (TLR) E INFLAMACIÓN

Las células microgliales son la población residente de tipo macrófago dentro del SNC. La activación de la microglía podría tener efectos protectores para las neuronas, la sobre activación de estas células conduce a productos inflamatorios que pueden causar una neuroestructura. Numerosos TLR, que se han identificado en células microgliales, responden a varios ligandos de TLR, Entre estos receptores, la estimulación de TLR4 en células microgliales se ha relacionado con lesión por oligodendrocitos, neurodegeneración y apoptosis de microglía (Fernández & cols., 2009)

Al reconocer a sus ligandos específicos los TLR inician una cascada de señalización intracelular que puede ser dependiente o independiente de MyD88. En la vía dependiente de MyD88, TRAF6 es un

factor indispensable que se ubiquitina para reclutar a los complejos TAK1 e IKK. Una vez IKK es fosforilado, inducirá la activación y translocación al núcleo de NF- κ B (p50 y p65) para promover la producción de citocinas proinflamatorias. A su vez, TAK1 activa a las MAPK, culminando en la inducción de la expresión de moléculas coestimuladoras, quimiocinas y citocinas. La vía independiente de MyD88 es iniciada por TRIF y TRAM, que provocan la activación de TKB1 y su capacidad de fosforilar a los factores IRF3 y 7 para su translocación homodimérica al núcleo, en donde impulsarán la producción de IFN. Esta vía puede también inducir la activación de NF- κ B (Vadillo & cols., 2012).

Por otro lado, se ha demostrado que la inflamación (periférica o central) está asociada con enfermedades metabólicas. La inflamación puede inducir la liberación del factor de necrosis tumoral citoquina alfa (TNF- α), que produce resistencia a la insulina por la inhibición del receptor de insulina. La actividad de tirosina quinasa. Del mismo modo, TNF- α aumenta la secreción de interleucina- (IL-) 1 β e IL-6, lo que disminuye la secreción de adiponectina. Esta inhibición produce una disminución de la oxidación de las grasas y un aumento de las

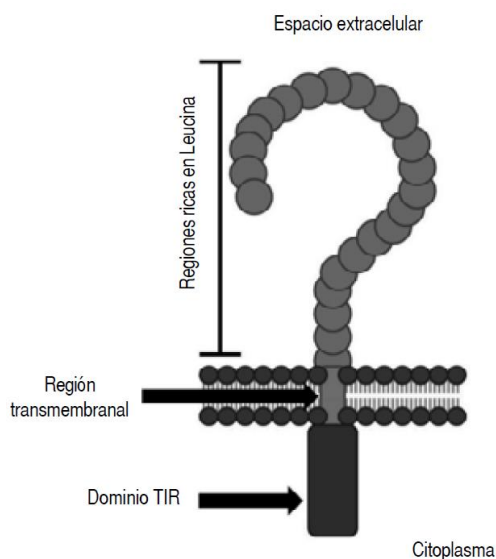


Figura. 3: Estructura general de los receptores tipo Toll. Los TLRs poseen una región extracelular rica en repeticiones de leucina (LRRs), a través de la cual reconoce a sus ligandos específicos; una región transmembranal, y una región intracelular en donde se localiza el dominio TIR. Dependiendo del ligando reconocido, el dominio TIR reclutará a una proteína adaptadora para la ulterior transducción de señales.

moléculas inflamatorias, demostrando la obesidad causada por el consumo de una DHC. Indujo un aumento de la resistencia a la insulina y la inflamación del hipotálamo. En este sentido, se sabe que, a nivel central, la activación microglial disminuye la plasticidad neuronal y la formación de sinapsis, así como la inflamación, y puede aumentar la fosforilación de TAU y la formación de beta amiloide (A β) (Diaz y cols., 2018).

1.8. CARACTERÍSTICAS CONDUCTUALES

Los modelos animales han sido una herramienta clave en la investigación, pues han permitido identificar procesos fisiológicos, bioquímicos, conductuales, que se asemejan a los procesos respectivos en el ser humano. Lo que ha permitido alcanzar una mayor comprensión en gran variedad de campos, así como predicciones más acertadas en cuanto a respuestas del organismo ante diversos estímulos, ambientes y tratamientos (Mora G. y Salas C. 2014)

Un modelo animal es utilizado para investigar fenómenos biológicos o patobiológicos. Held dio una definición:

"Un organismo vivo en el que se puede estudiar la biología o el comportamiento normativo, o en el que se puede investigar un proceso patológico espontáneo o inducido, y en el que el fenómeno en uno o más aspectos se asemeja al mismo fenómeno en humanos u otras especies de animales". Lo que generalmente se entiende por el término "modelo animal".

La importancia y la validez con respecto a la utilidad de los resultados generados en un modelo animal dependen de la selección de un modelo animal adecuado. Un buen conocimiento de la anatomía y fisiología comparadas es una ventaja obvia cuando se desarrolla un modelo animal (Hau y cols., 2003).

1.8.1. CLASIFICACIÓN DE MODELOS

La mayoría de los modelos de animales de laboratorio se desarrollan y utilizan para estudiar la causa, la naturaleza, y cura de trastornos humanos. Se clasifica convenientemente en uno de los siguientes cinco grupos, de los cuales los tres primeros son los más importantes:

- Modelos de enfermedades inducidas (experimentales)
- Modelos de enfermedad espontánea (genética)
- Modelos de enfermedades transgénicas.

- Modelos de enfermedades negativas.
- Modelos de enfermedad huérfana (Hau y cols, 2003).

1.8.2. CONDUCTAS

1.8.2.1. Prueba de Campo Abierto

Esta prueba también ha sido ampliamente utilizada para medir ansiedad. La prueba de campo abierto (PCA) es un recinto generalmente cuadrado, rectangular o circular con paredes alrededor que impiden la salida o escape del animal. Desde los estudios originales de Hall en 1934, la prueba de campo abierto ha sido utilizada para medir las reacciones de los roedores en un ambiente que no tiene salida. En los diferentes laboratorios la prueba varía en cuanto a su duración que puede ir desde dos minutos hasta 30 minutos. En este periodo de tiempo, lo que se analiza es el comportamiento exploratorio y la respuesta ante ese ambiente “novedoso” (Mora G. y Salas C. 2014).

1.8.2.2. Test de suspensión de cola

Desde su introducción hace casi 20 años, el test de suspensión de cola (TSC) se basa en la observación del comportamiento de los roedores, además, se ha convertido en uno de los modelos más utilizados para fomentar la actividad de tipo antidepresivo en roedores. La prueba se basa en el hecho de que los animales sometidos al estrés ineludible a corto plazo al ser suspendidos por su cola desarrollarán una postura inmóvil. El tiempo transcurrido inmóvil por el animal durante un período de 6 minutos y la cantidad de tiempo que pasan inmóviles se registra manualmente o durante un dispositivo automatizado lo cual se interpreta como una medida del comportamiento depresivo. la inmovilidad en el TSC se debe a la incapacidad o la renuencia a mantener el esfuerzo en lugar de una hipoactividad generalizada. El uso de la TSC ha aumentado sustancialmente en los últimos años como un modelo para evaluar el comportamiento (Cryan F. y cols., 2005; Abelaira H.M y cols., 2013).

2. JUSTIFICACIÓN

La investigación en la última década ha establecido que el síndrome metabólico puede ser el resultado de una activación inmune innata en respuesta a la sobrealimentación. Si bien este tipo de inflamación existe ampliamente en diferentes tejidos, el SNC se encuentra en una posición primaria y de gran impacto para la inducción del síndrome metabólico por inflamación nutricional. La investigación en los últimos años ha diferenciado significativamente las vías inflamatorias hipotalámicas subyacentes a estos trastornos metabólicos, y la intracelular inducida por sobre alimentación (Dongsheng Cai y Tiewen Liu, 2012), El consumo excesivo de alcohol es responsable del daño a la estructura y función del cerebro y al deterioro asociado de la cognición y el comportamiento (Sullivan y Pfefferbaum, 2005). La siguiente investigación dará a conocer los daños del consumo constante de alcohol combinado con una dieta hipercalórica (DHC) evaluando los daños provocados durante el tiempo de tratamiento para hacer la expresión de los factores que puedan causar daños en las células y al desarrollo de DM2 buscando por diferentes técnicas directas e indirectas los daños que se puedan tener en cerebro, corazón, hígado y páncreas.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la administración crónica de etanol sobre el proceso inflamatorio y de estrés oxidativo en ratas con síndrome metabólico.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Establecer el síndrome metabólico en ratas
- II. Evaluar el estado ansiogénico de los sujetos con SM administrados con etanol.
- III. Evaluar el proceso inflamatorio en el hígado, hipocampo, corteza temporal y núcleo paraventricular del hipotálamo de ratas con síndrome metabólico administradas con etanol.
- IV. Medir el estrés oxidativo en el hígado, hipocampo, corteza temporal y núcleo paraventricular del hipotálamo de ratas con síndrome metabólico administradas con etanol.

4. METODOLOGIA

4.1. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

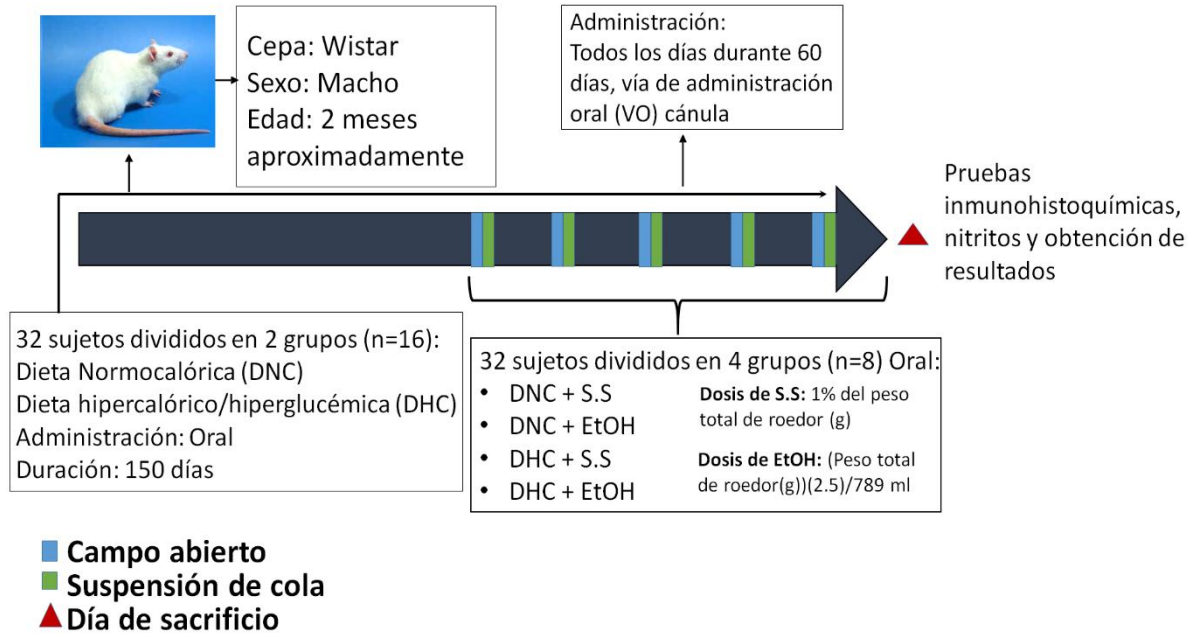


Figura. 4: Diagrama general de trabajo. Se indica el procedimiento realizado, así como las etapas en los sujetos de experimentación.

4.2. Sujetos de experimentación

Se utilizaron 32 ratas (*Rattus norvegicus*) machos de la cepa Wistar con un peso aproximado de 230 g, las cuales se alojaron en cajas de acrílico (n=4), con temperatura de 24°C, con 50% de humedad y ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas, estas fueron provistas por el bioterio Claude Bernard de la BUAP, asimismo todos los procedimientos de manejo y disección de los animales fueron sujetos a los protocolos aprobados por los comités nacionales (NOM-062-ZOO-1999) sobre el manejo y el uso de animales de laboratorio, los grupos utilizados con acceso *ad libitum* a agua y alimento.

4.3. Control de peso

Las ratas se dividieron en dos grupos; el primer grupo fue alimentado con una dieta normocalórica (DNC) (n=16/grupo), el segundo grupo se alimentó con una dieta hipercalórica (DHC) (n=16/grupo), esta alimentación tuvo una duración de 150 días para establecer el SM en las ratas figura 4.

4.4. Administración de solución salina y etanol

Los animales del grupo control y problema se subdividieron en dos grupos respectivamente, los cuales son: DNC S.S, DNC EtOH, DHC S.S y DHC EtOH. Los siguientes grupos (n= 8): control (S.S) 0.1 mL/10 g y etanol (EtOH) (2.5 mg/kg). Las administraciones de S.S o EtOH se realizó por vía oral (VO) con cánula durante 60 días más a partir del día 91 de ambas dietas (DNC/DHC) figura 4.

4.5. Pruebas de conducta

4.5.1 *Campo abierto*: Esta prueba consiste en evaluar la reacción de un animal experimental en un recinto amplio y muy iluminado, y registrar si éste explora de manera activa el recinto experimental o bien si se queda inmovilizado cerca de las paredes de este (Redolar Ripoll, 2008). Se evaluó el estado ansiogénico de los sujetos de experimentación por medio del modelo de campo abierto, el cual evaluó la respuesta incondicionada de ansiedad de los animales al encontrarse en un ambiente ajeno a ellos, tal como el campo abierto. En esta evaluación, las ratas se colocaron en el cuadro central del modelo y se dibujó la trayectoria que la rata siguió en un período de 10 min. De la misma forma se registró el número de veces que dicho sujeto paso por el centro. La evaluación de este modelo se realizará los días -1, 15, 30, 45 y 60 de los respectivos tratamientos.



Figura. 5: El modelo consiste en un cubo de madera, en cuya base se encuentran dividida en 9 cuadrados de 20*20 cm

4.5.2 Suspensión de cola: La prueba de suspensión de la cola es una prueba de comportamiento del roedor, se espera que afecten los comportamientos relacionados con la depresión. Los roedores están suspendidos por sus colas con cinta adhesiva, en una posición tal que no puede escapar o aferrarse a superficies cercanas. Durante esta prueba, los comportamientos orientados hacia el escape son cuantificados para su análisis. (Can, T. Dao y cols, enero 2012).

Las ratas de los diferentes grupos experimentales fueron sometidas a esta prueba; se suspendieron de la cola durante 5 minutos donde se registró el tiempo de inmovilidad y el de movimientos bruscos. La evaluación de este modelo de depresión se realizó en los días 0, 16, 31, 46 y 61 de los respectivos tratamientos.



Figura. 6: El modelo consiste en un ortoedro de madera, en cuya cara superior estará sujeto un lazo con una pinza para sujetar a la rata por la cola (30*30*50 cm).

4.6. Evaluación de estrés oxidativo

Este ensayo se basa en una reacción de diazotización que fue descrita originalmente por Griess en 1879. A través de los años, se han descrito muchas modificaciones a la reacción original. El sistema de reactivo de Griess se basa en la reacción química que se muestra en la Figura. 3, que utiliza sulfanilamida y dihidrocloruro de N-1-naftiletildiamina (NED) en condiciones ácidas (ácido fosfórico). Este sistema detecta NO₂⁻ en una variedad de matrices líquidas biológicas y experimentales, como plasma, suero, orina y medio de cultivo de tejidos. La sensibilidad al nitrito depende de la matriz (Promega Corporation, 2009).

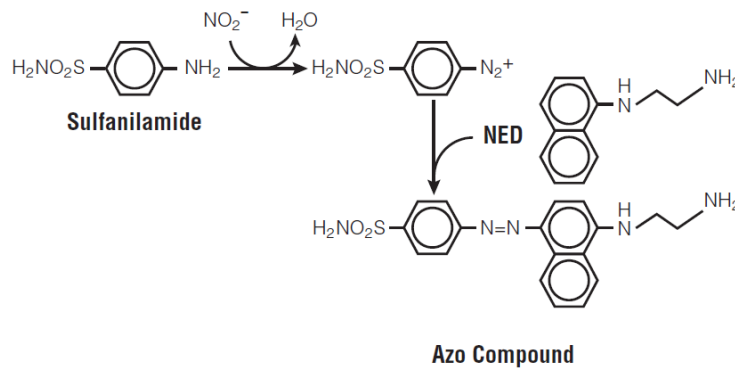


Figura. 7: Mecanismo de acción de del reactivo de Griess

Tomado de Promega Corporation, Griess Reagent System

La preparación del reactivo de Griess, se disolvió NED (0.01 g) con Ac. Fosfórico al 5% en 1 ml, adicionalmente se disolvió la sulfanilamida (0.27 g) en 6 ml de Ac. Fosfórico al 5%, posteriormente se mezcló el NED y la sulfanilamida y finalmente se aforo a 10 ml con Ac. Fosfórico y se almaceno en oscuridad hasta su uso.

La elaboración de la curva de calibración y lectura de la muestra se realizó por duplicado tomando los pozos No. 1 y 2. Se colocaron 50 µL de agua destilada en los pozos del A hasta G, posteriormente se colocaron 200 µL de Nitrito de sodio, solo en el pocillo H. Se realizaron diluciones seriadas tomando 100 µL del Nitrito de sodio del pocillo H se vertieron en el pocillo G, nuevamente se tomaron 100 µL de la dilución de este pozo y se repitió el procedimiento hasta llegar al pocillo B, los 100 µL restantes se desechan dejando el pozo A solo con agua destilada. Los pozos de 3 al 12 fueron ocupados para las muestras las cuales

se hicieron por duplicado tomando en cuenta la posición de llenado de los pozos, los cuales fueron de forma horizontal en el siguiente orden: Para corteza B-C, hipocampo D-E y estriado F-G. Se colocaron 50 μ L de agua destilada en los pozos, posteriormente 50 μ L de la muestra biológica y por último 100 μ L de reactivo de Griess en **total oscuridad** tanto los pozos de la curva de calibración como en los pozos con la muestra biológica. Una vez terminado el llenado de la placa se dejó en reposo durante 30 min en **completa oscuridad** a temperatura ambiente, terminado este tiempo se realizó la lectura de absorbancia a 546 nm.

4.7 Evaluación de proteínas totales

El reactivo de Bradford se puede usar para determinar la concentración de proteínas en la solución. El procedimiento se basa en la formación de un complejo entre el tinte, Brilliant Blue G Figura. 4 y las proteínas en solución. El complejo colorante proteico provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm. La cantidad de absorción es proporcional a la proteína presente (Sigma Aldrich). Hay tres formas del colorante azul brillante de Coomassie están en equilibrio ácido-base al pH ácido habitual. Las formas roja, azul y verde tienen máximos de absorbancia a 470, 590 y 650 nm, respectivamente. El azul es la forma que une a la proteína, formando un complejo que absorbe intensamente la luz a 594 nm. El reactivo de Bradford no requiere dilución (Orna Ernst, Tsaffrir Zor, 2010)

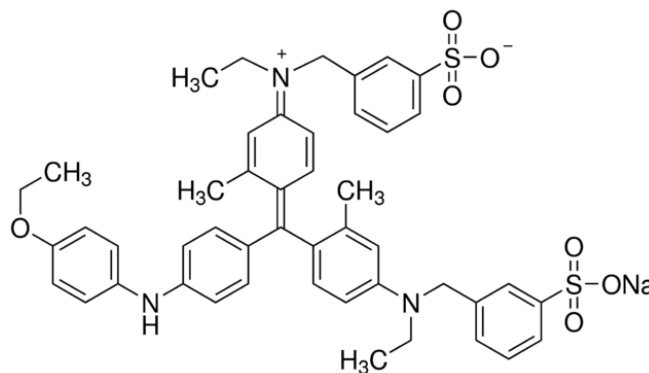


Figura. 8: Molécula representativa de Brilliant Blue G
Tomado de SigmaAldrich.com

El reactivo de Bradford no necesito preparación debido a que se adquirió ya elaborado de fabrica solo se mantuvo en las condiciones que marca el proveedor.

La elaboración de la curva de calibración y lectura de la muestra se realizó por duplicado, para la curva de calibración se tomaron los pozos No. 1 y 2, se deja vacío el pozo A y partir del pozo B se agrega 1 μL de albumina y de forma ascendente se va aumentando la cantidad de μL hasta el pozo G se agregaron 7 μL , posteriormente en el pozo vacío A se agregaron 10 μL de agua destilada y de forma descendente reduciendo la cantidad de μL hasta el pozo G hasta llegar a 3 μL agregados. Para la lectura de la muestra se agregaron 10 μL de cada muestra en los pozos A3 - A12 y de los pozos B3 - B8 repitiendo el procedimiento con los pozos de C al H, al término de colocar los 10 μL se agregaron 200 μL de reactivo de Bradford en **total oscuridad** tanto los pozos de la curva de calibración y de los pozos con la muestra biológica. Terminado el llenado de la placa se dejó en reposo durante 15 min en **completa oscuridad** a temperatura ambiente, terminado este tiempo se realizó la lectura de absorbancia a 620 nm.

4.8 Inmunohistoquímicas

Los cerebros obtenidos el día del sacrificio, fueron colocados en PBS 1X (0.01M), posteriormente se realizaron 2 cortes de forma que se obtuvieran 3 muestras las cuales fueron colocadas en un frasco con paraformaldehído 4X, culminado esta fase las muestras se sometieron a deshidratación mediante la técnica de inclusión, una vez terminada la técnica se realizaron cortes en microtomo a 7 μm donde los cortes fueron pescados en porta objetos previamente gelatinizados para fijar los cortes obtenidos, finalizado los cortes se dejaron secar durante 12 hrs, para que posteriormente se aplicara la técnica de desparafinado dejando así todos los cortes limpios dejando el tejido fijado en el porta objetos.

Todos los portaobjetos con tejidos se les coloco PBS 1X frio, inmersión en solución de albumina bovina al 2% (ABS) en PBS 1X cámara fría, inmersión de solución de tritón X – 100 al 0.2% y se limpió con PBS 1X. En oscuridad se incubo el anticuerpo primario a 4°C diluido en ABS 1%, GFAP – 1:1000.

La lectura de las placas se realizó mediante un microscopio de fluorescencia leídas con objetivo 20X y luz reveladora de DAPI y RODAMINA. Obtenidas las imágenes fueron analizadas mediante el software ImageJ.

5 RESULTADOS

9.1 PRUEBAS ZOOMÉTRICAS

La alimentación implementada fue una dieta normocalórica (DNC) e hipercalórica (DHC) para el aumento de peso de cada grupo los cuales tuvieron un incremento a lo largo de 23 semanas.

Ambos grupos mantuvieron un constante aumento de peso muy cercano, la DHC administrada hizo que después de las 23 semanas el grupo de DHC tuviera un 16.80 % de decremento de peso sobre el grupo control de DNC, en las últimas 2 semanas tuvo una tendencia aumentar el peso el grupo DHC respecto a DNC la cual comenzó a decrecer.

5.1.1 RELACIÓN DE ALIMENTACION vs TIEMPO

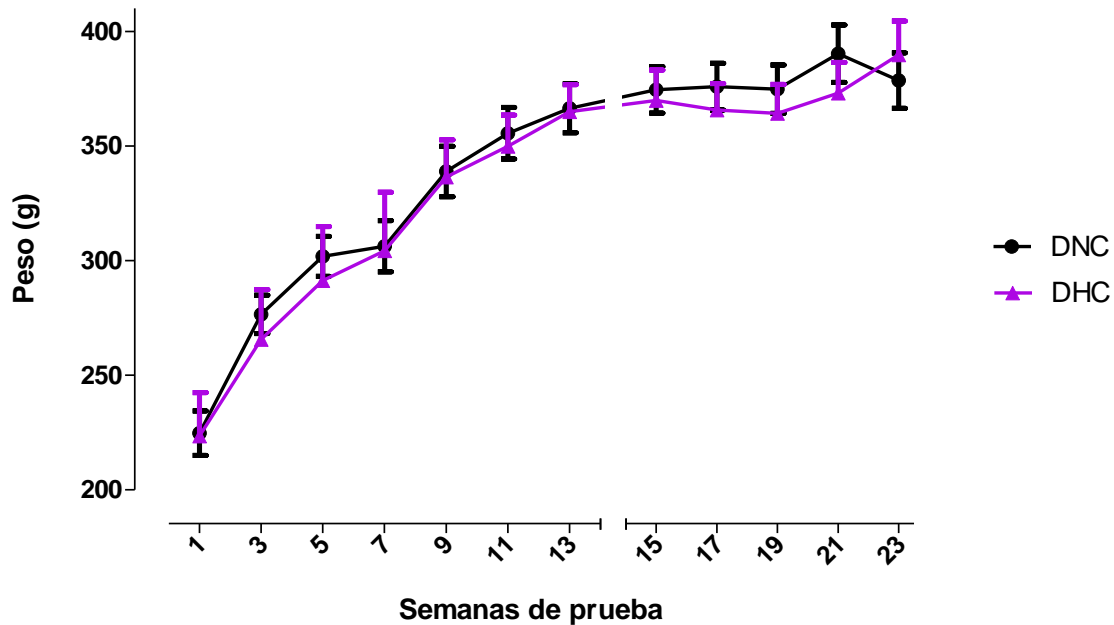


Figura. 9: Se muestra el aumento constante de peso de ambos grupos hasta la semana 14 donde el incremento era similar, a partir de la semana 15 hay un cambio notorio en el grupo DNC vs DHC donde se realizó la administración de etanol VO, cambiando respuesta al cambio de peso para la DNC a decrecer y DHC en ascenso. (detallado en la figura. 11).

Tabla 1: Peso promedio de los grupos durante las 23 semanas

Grupo	PESO TOTAL DE SEMANAS	
	CONTROL (DNC)	SM (DHC)
Media ± ES	338.7 ± 14.70	333.3 ± 14.73

5.1.2 INDICE DE MASA CORPORAL (IMC)

Ambos grupos partieron de un mismo IMC cambiando constantemente en un periodo de 14 semanas en las cuales el grupo con DNC se mantuvo por encima del grupo alimentado con una DHC, entre la semana 13 y 15 hubo un drástico aumento en el grupo DNC y en DHC comenzó a descender, estos cambios fueron antes de comenzar con la administración de EtOH durante la semana 13-14. Comenzando la administración de EtOH el IMC del grupo DNC aumento por una semana, sin embargo, durante las siguientes semanas comenzó a disminuir y el grupo DHC tuvo el mismo efecto pero manteniendo una estabilidad al final del experimento.

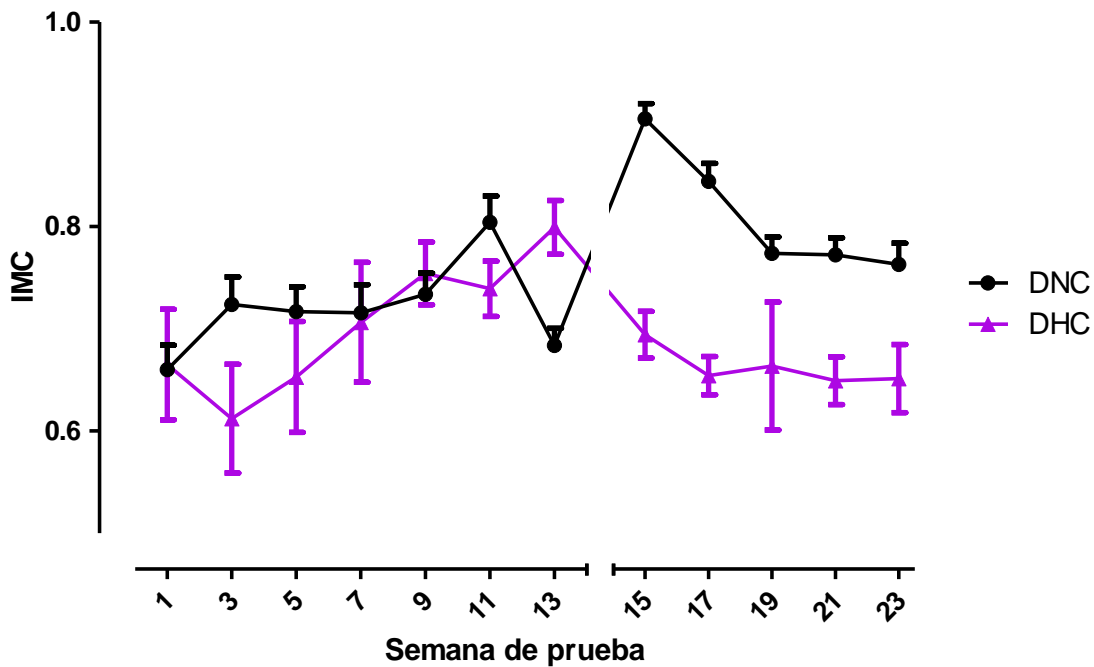


Figura. 10: Ambos grupos mantuvieron un incremento en su IMC sin embargo, a partir de la semana 14 ambos grupos comenzaron que un IMC igual, dado que los grupos fueron sometidos a diferentes dietas hubo grandes diferencias, el grupo de DHC obtuvo un decremento en su IMC de 13.39% a comparación del grupo de DNC.

Tabla 2: El IMC promedio durante las 23 semanas.

Grupo	IMC TOTAL DE SEMANAS	
	CONTROL (DNC)	PROBLEMA (DHC)
Media ± ES	0.7581 ± 0.0198	0.6868 ± 0.0155

Durante esta prueba las IMC del grupo control se mantuvo siempre por encima del grupo problema a pesar de que la de la carga de carbohidratos, aunque el peso corporal registrado en la figura 9 muestra que el peso si fue aumentando la grasa almacenada en tejido no resulto ser significativa para el cálculo del IMC.

5.1.3 PESO, RELACION DIETA Y CONSUMO DE ALCOHOL

El consumo de una DHC y el constante consumo de etanol influye en los cambios metabólicos, por lo cual hay variación de peso entre grupos, en la figura 9 se muestra solamente los grupos con dieta con incremento constante en el peso, en la figura 11 se muestran los resultados de los grupos de la dieta y alcohol que influye en el incremento de peso. La tabla 3 muestra el incremento o decremento de cada grupo, DNC EtOH en las últimas dos semanas tiende a decrecer y DHC EtOH comienza a tener un incremento en las últimas dos semanas.

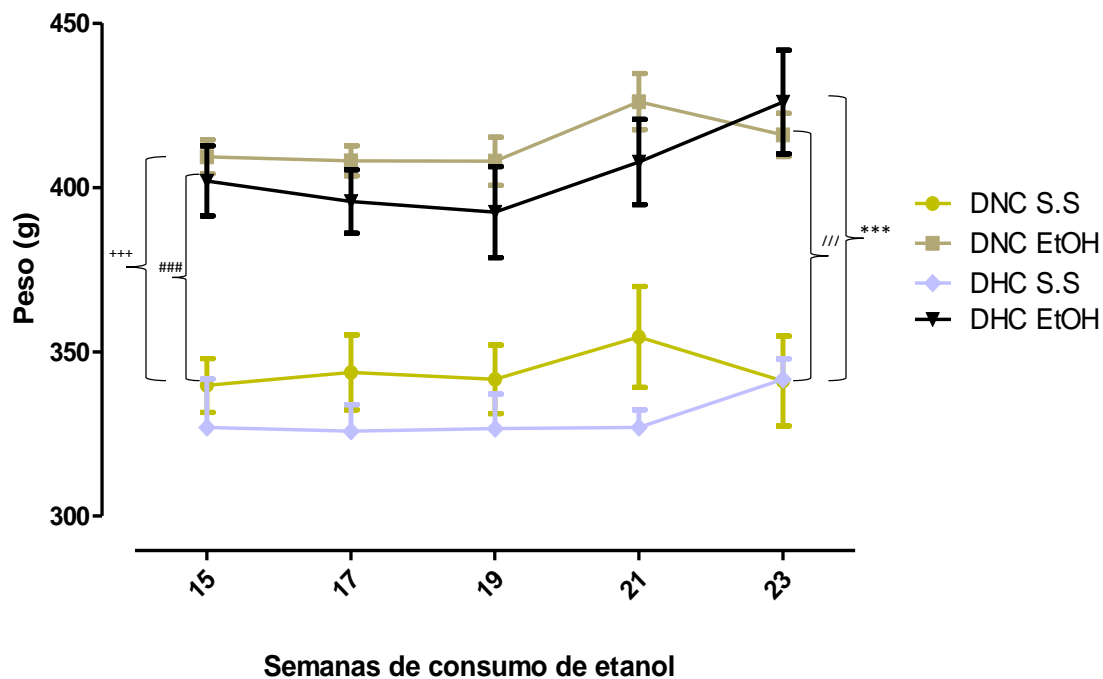


Figura. 11: El periodo de ingesta influyo en los cambios metabólicos los cuales constataron que el consumir EtOH aumenta el peso caso contrario en el consumo de S.S que el peso fue menor. En ambos la influencia de las dietas no intervino notoriamente, sin embargo, al concertar los grupos como en la Figura. 9 el aumento de peso es evidente con tendencias a cambio.

ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni, $p < 0.05$

- +++ $p < 0.0001$ DNC S.S vs DNC EtOH
- ### $p < 0.0001$ DNC S.S vs DHC EtOH
- /// $p < 0.0001$ DNC EtOH vs DHC S.S
- *** $p < 0.0001$ DHC S.S vs DHC EtOH

Tabla 3: Peso por grupo durante las 5 semanas de la administración de etanol.

Grupo	PESO POR GRUPOS			
	DNC + S.S	DNC + EtOH	DHC + S.S	DHC + EtOH
Media \pm ES	344.2 \pm 2.666	413.5 \pm 3.477	329.6 \pm 3.016	404.8 \pm 5.913

5.2 PRUEBAS CONDUCTUALES

Las pruebas de campo abierto y suspensión de cola fueron monitoreadas y posteriormente analizadas para determinar el número de movimientos realizados por cada sujeto experimental de los grupos. Los movimientos que se cuantificaron de los roedores: erguidos (5 minutos) y cuadros visitados (10 minutos).

5.2.1 SUSPENSIÓN DE COLA



Figura. 12: La ↑ flecha indica el erguimiento constante de la rata cuando esta intenta liberarse y se contabilizan los intentos de liberación para poder cuantificarlos para su análisis.

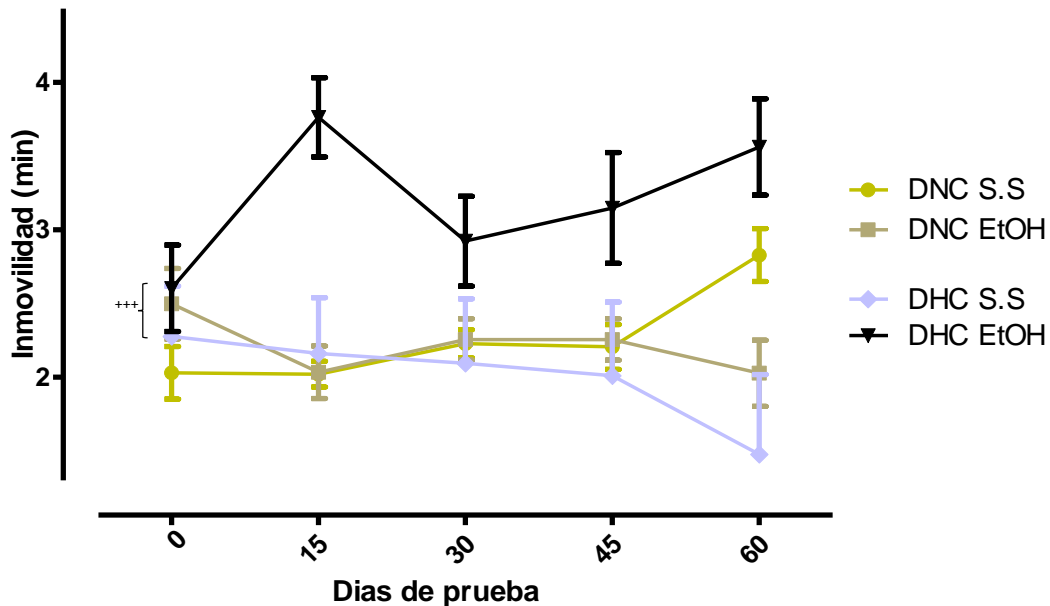


Figura. 13: ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni, con $p < 0.05$ +++ $p < 0.0002$ con respecto a DHC S.S VS DHC EtOH.

Tabla 4: Tiempo de inmovilidad por grupo durante las semanas de administración de etanol.

Grupo	SUSPENSIÓN DE COLA			
	DNC + S.S.I	DNC + EtOH	DHC + S.S.I	DHC + EtOH
Media ± ES	2.263 ± 0.1479	2.215 ± 0.0870	2.005 ± 0.1387	3.201 ± 0.2102

Los grupos DNC EtOH, DNC S.S y DHC S.S tuvieron un comportamiento similar durante 45 días con una media de actividad promedio de 2.161 y con una diferencia del 67.51% respecto al grupo DHC EtOH, estos tres grupos tuvieron tendencias a cambio en los últimos 15 días reflejando un comportamiento diferente, con mayor tendencia a cambios en DNC S.S y DNC EtOH. Sin embargo, el grupo DHC EtOH mostro cambio significativo sobre el resto de los grupos con $p < 0.0002$. Los índices de incremento o decremento indicados en la tabla 4 muestran la actividad de cada grupo mostrando un índice mayor en el grupo DHC S.S vs DHC EtOH con un 62.63%.

5.2.2 CAMPO ABIERTO

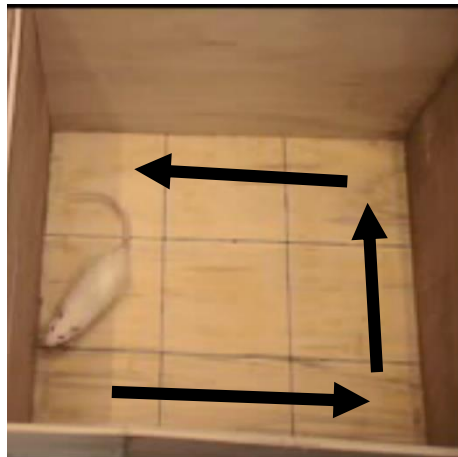


Figura. 14: La → indica sin importar la dirección por la que la rata debe pasar n veces para pronosticar su ansiedad.

La rata realiza una exploración sobre los costados de la caja para encontrar un lugar seguro

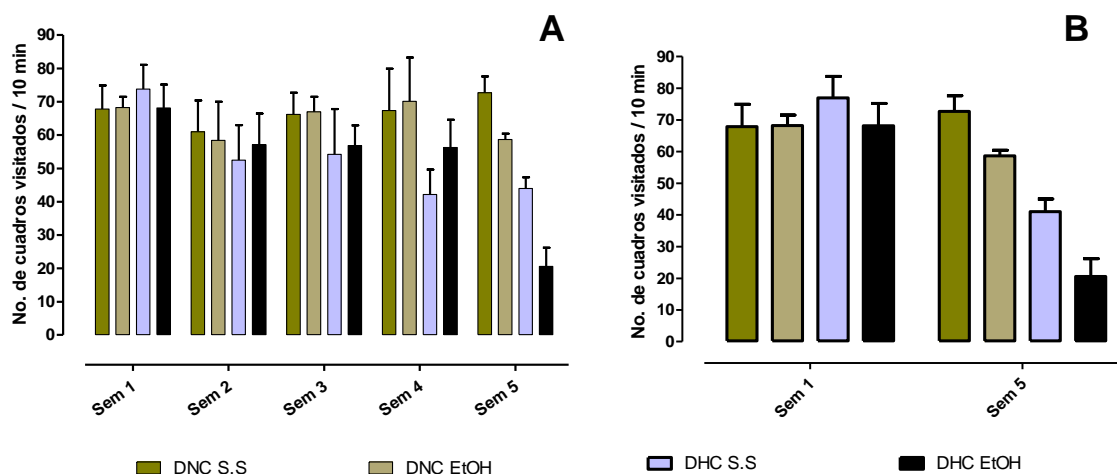


Figura. 15: ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni.
A) No tiene diferencia significativa $p < 0.1246$. Los datos graficados por cada semana de la prueba muestran un constante decremento notable en los grupos con DHC
B) No tiene diferencia significativa $p < 0.6530$ La grafica representativa sobre la 1era semana y la 5ta semana se puede analizar la diferencia entre la actividad de las ratas.

Tabla 5: Numero de cuadros visitados dividido por grupo durante las 5 semanas de la administración de etanol.

Grupo	CUADROS VISITADOS			
	DNC + S.S.I	DNC + EtOH	DHC + S.S.I	DHC + EtOH
Media \pm ES A	67.04 \pm 1.872	64.49 \pm 2.488	53.33 \pm 5.622	51.80 \pm 8.105
Media \pm ES B	70.29 \pm 2.429	63.48 \pm 4.810	58.90 \pm 14.90	44.36 \pm 23.76

La actividad de cada grupo disminuyo durante la administración del etanol, obteniendo una $p < 0.1246$ sin cambio significativo entre los grupos, la figura 15 A nos detalla la actividad de los grupos por semana la cual fue disminuyendo en ambos y manteniéndose en un rango promedio los grupos de DNC. En la figura 15 B se detalla la semana 1 vs 5 haciendo la comparación detallada de comportamiento, observando una disminución por grupo considerable. En la tabla 5 nos muestra la actividad media de la actividad general de cada grupo mostrando que los grupos de DHC tienen una actividad menos comprobándola con la figura 13, la actividad general registrada entre la semana 1 y 5 se vio reducida en un 25.55%. El grupo de DHC EtOH mostro una reducción de actividad notablemente desde la prueba inicial a la final, se obtuvo una disminución de actividad del 69.76%.

5.2.3 VECES DE EXPLORACION POR CUADRO CENTRAL

En nuestros resultados no se encontraron diferencias significativas (figura 17 A) en la actividad, los cambios notables de la semana 1 a la 5 figura 17 muestra cambios respecto a las semanas transcurridas en los diferentes grupos, los grupos de DNC y DHC ambos administrados con EtOH redujeron su actividad al término de la última semana, los grupos con S.S.I mantuvieron actividad promedio durante las 5 semanas. En la tab 6 describe la estadística de los grupos, hay variaciones respecto a los grupos DNC y DHC dado que la actividad de cada grupo vario en la semana 03 figura 17 A lo cual estaría afectando la Media \pm ES determinándose así los resultados de cada grupo. La actividad general durante las 5 semanas fue disminuyendo hasta un 79.16% y la actividad del grupo DHC EtOH durante las 5 semanas disminuyo totalmente a un 100% figura 17 B.



Figura. 16: La posición que guarda la rata en esta imagen es la ideal para cuantificarla cuando pasa por el centro n veces.

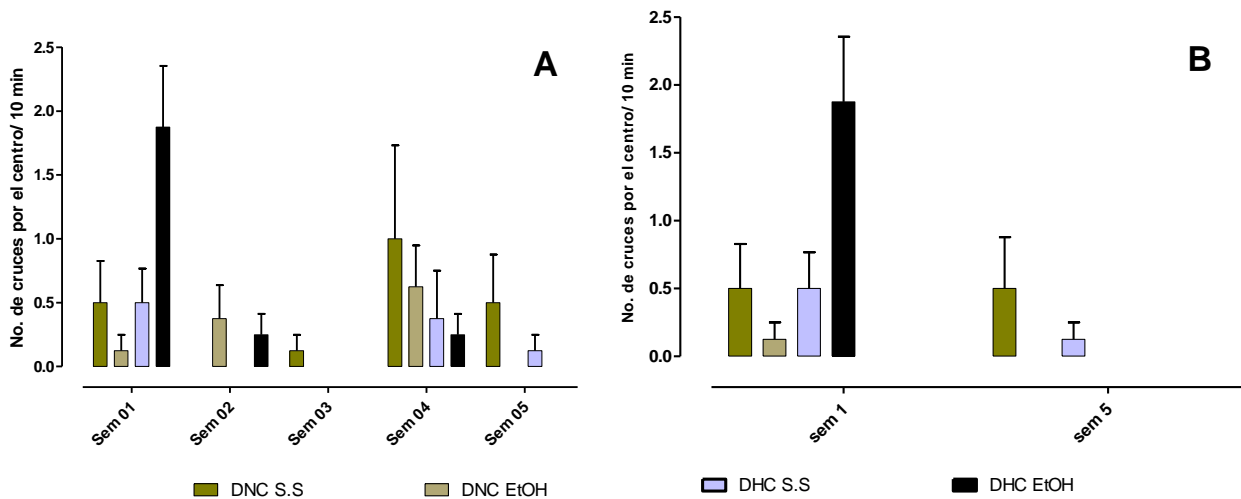


Figura. 17: ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni $p < 0.05$. El periodo evaluado refleja que la actividad disminuyó notablemente en los grupos de EtOH. La evaluación se llevó a cabo para evaluar la ansiedad de cada grupo.
A) No presenta comparación significativa $p < 0.7367$.
B) No presenta comparación significativa $p < 0.6512$

Tabla 6: Número de veces que visito el cuadro central por grupo.

Grupo	CUADROS VISITADOS AL CENTRO			
	DNC + S.S	DNC + EtOH	DHC + S.S	DHC + EtOH
Media ± ES A	0.475 ± 0.354	0.200 ± 0.101	0.225 ± 0.121	0.425 ± 0.175
Media ± ES B	0.937 ± 0.937	0.312 ± 0.187	0.062 ± 0.062	0.500 ± 0

5.3 ESTRÉS OXIDATIVO

5.3.1 CEREBRO

Se describe la concentración de NO afectado por el SM, generado por el estrés oxidativo aumentando así el iNOS, las concentraciones de cada una de las regiones del cerebro corteza, hipotálamo y estriado. Además de cómo está relacionado el estrés oxidativo en el aumento del NO dado que el SM favorece este medio junto con el consumo constante de EtOH. Esta prueba es un medio indirecto de comprobar que hay daño a nivel celular principalmente en el mitocondria y retículo endoplasmático.

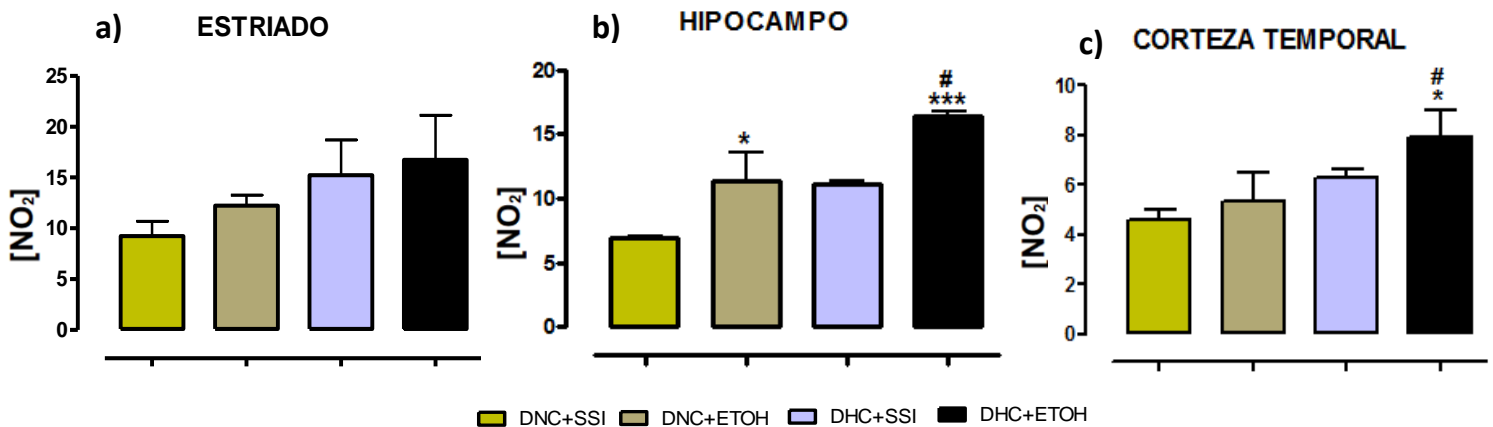


Figura. 18:

Estriado No muestra diferencia significativa. ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni.
Hipocampo **P< 0.0010. ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni.
Corteza temporal *p<0.0157. ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni.

Tabla 7: Concentración de nitritos por zona cerebral y por grupo.

Media ± ES	Grupo	NITRITOS CEREBRO			
		DNC S.S	DNC EtOH	DHC S.S	DHC EtOH
		ESTRIADO	9.259 ± 1.022	12.25 ± 0.7250	15.25 ± 1.988

	HIPOCAMPO	6.918 ± 0.077	11.40 ± 1.242	11.09 ± 0.2229	16.47 ± 0.1476
	CORTEZA	4.584 ± 0.2849	5.318 ± 0.5712	6.276 ± 0.1699	7.923 ± 0.7625

Tabla 8: Diferencia porcentual entre los grupos problema respecto al grupo control

Grupo	% DE CONCENTRACION DE NO-			
	DNC S.S.I	DNC EtOH	DHC S.S.I	DHC EtOH
ESTRIADO	100%	32.30	64.70	80.91
HIPOCAMPO		64.79	60.31	138.07
CORTEZA		16.01	36.91	72.84

El grupo DNC S.S es la referencia del 100% ya que es grupo control y se toma iniciar la diferencia de nitritos de forma porcentual de cada grupo, con el fin de ver el incremento de NO.

En la tabla 7 se muestran las 3 zonas evaluadas para obtener la concentración de NO, la cual nos muestra que el estriado contiene la mayor cantidad de NO, posteriormente Hipocampo y por último corteza. Para poder entender la diferencia entre los grupos en la tabla 8 nos muestra las diferencias porcentuales de cada grupo respecto al grupo DNC S.S, esta diferencia incrementa en el grupo de DHC EtOH dado que es el grupo el cual se indujo el SM y la administración de EtOH provocando una alteración en la concentración de NO.

5.3.2 CORAZÓN

El estrés oxidativo fue evaluado mediante la concentración de NO, la concentración de NO analizado calculado para cada grupo fue de: *DNC S.S.I* 1.346 y *EtOH* 1.839, para *DHC S.S.I* 0.998 y *EtOH* 0.968. Partiendo del grupo control DNC S.S.I los contrastes de los grupos fue de un 36.64% de incremento en DNC EtOH, los grupos DHC S.S.I y EtOH fue de 25.85 y 28.03% de decremente respectivamente.

- Aurícula derecha (AD) muestro una diferencia significativa entre los grupos DNC EtOH vs DHC EtOH ##.
- Aurícula izquierda (AI) obtuvo dos diferencias significativas una entre DNC EtOH vs DHC S.S.I * y DNC S.S.I vs DNC EtOH ##

- Ventrículo derecho (VD) tuvo dos diferencias significativas una de ellas DNC EtOH vs DHC EtOH # y DNC EtOH vs DHC S.S.I #.
- Ventrículo izquierdo no obtuvo ningún cambio significativo.

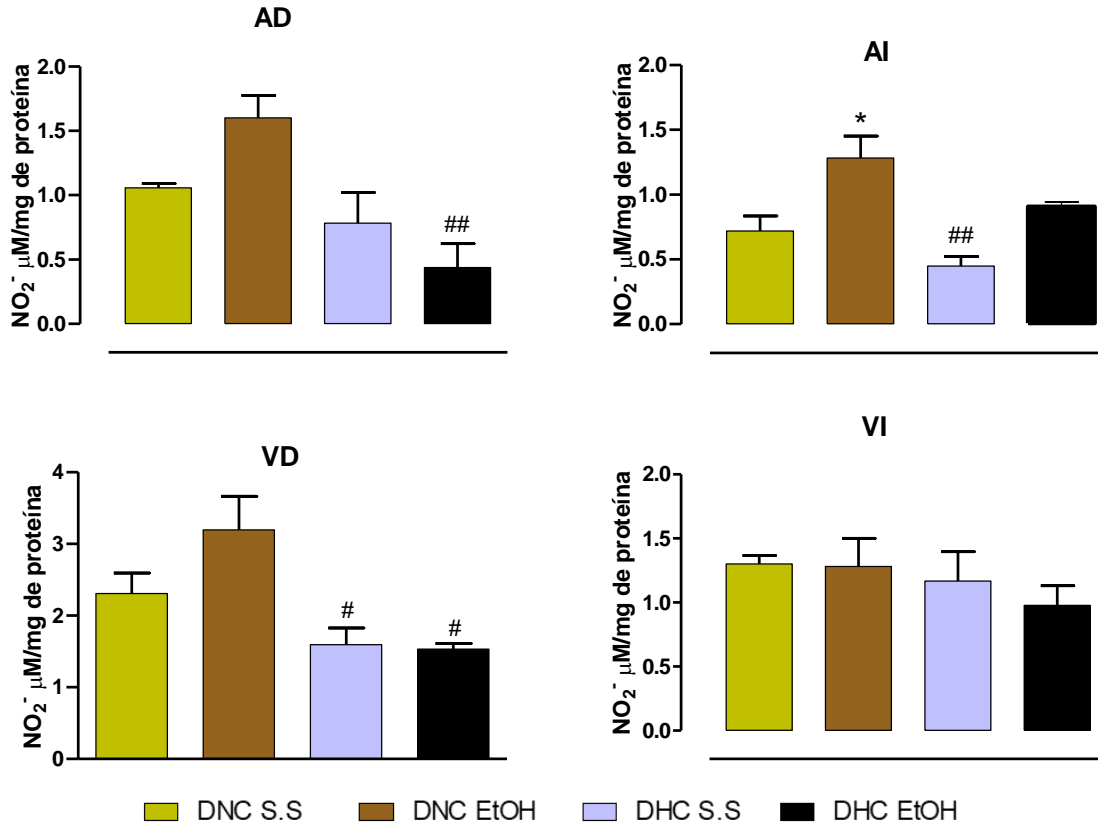


Figura.19: Cada grupo muestra variantes significativas en la concentración AD es la más afectada ante los cambios del estrés oxidativo, el grupo más notable en DHC EtOH. ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni con $p < 0.05$

- AD No presenta comparación significativa $p < 0.0071$
- VD No presenta comparación significativa $p < 0.0190$
- VI Presenta comparación significativa $p < 0.5368$
- AI No presenta comparación significativa $p < 0.0047$

Tabla 8: Concentración de nitritos de aurículas, ventrículos y grupo.

	Grupo	NITRITOS CORAZÓN			
		DNC S.S.I	DNC EtOH	DHC S.S.I	DHC EtOH
Media \pm ES	AD	1.057 \pm 0.032	1.600 \pm 0.173	0.7822 \pm 0.238	0.4387 \pm 0.1850
	VD	2.308 \pm 0.287	3.194 \pm 0.471	1.594 \pm 0.234	1.532 \pm 0.078
	VI	1.300 \pm 0.067	1.281 \pm 0.219	1.167 \pm 0.229	0.997 \pm 0.153
	AI	0.7190 \pm 0.117	1.282 \pm 0.171	0.449 \pm 0.072	0.907 \pm 0.036

Tabla 8: La tabla siguiente nos muestra los porcentajes de cada una de zona del corazón y los grupos.

	NITRITOS CORAZÓN			
Grupo	DNC S.S.I	DNC EtOH	DHC S.S.I	DHC EtOH
AD	100%	151.45	74.02	41.51
VD		138.39	69.07	66.37
VI		98.53	89.74	75.13
AI		178.25	62.44	126.16

	NITRITOS CORAZÓN %			
Grupo	DNC S.S.I	DNC EtOH	DHC S.S.I	DHC EtOH
DNC S.S.I	100	136.87	70.29	62.99
DNC EtOH	73.06	100	51.35	46.02
DHC S.S.I	142.26	194	100	89.62
DHC EtOH	158.73	217.26	111.57	100

concentraciones al 100% son referidas para interpretar la comparación entre los grupos, el incremento o decremento de cada grupo es el promedio de las concentraciones entre cada uno de los grupos.

5.3.3 HIGADO

Las pruebas realizadas para la obtención de nitritos revelaron cambios significativos el más notable es sobre el grupo DHC S.S.I** lo cual en la figura 20 se observa gráficamente la alta concentración en este grupo generando diferencias entre grupos, las cuales partiendo del grupo control DNC S.S.I obteniendo un 24.97% de decremento en la concentración de NO, en el caso del grupo DHC S.S.I obtuvo un 117.33% de incremento y un 10.86% en el grupo problema el cual incremento ligeramente sobre el grupo control. Los cambios con

menor cambio significativo fueron DHC S.S.I vs DHC EtOH # y los grupos DNC S.S.I vs DHC S.S.I +.

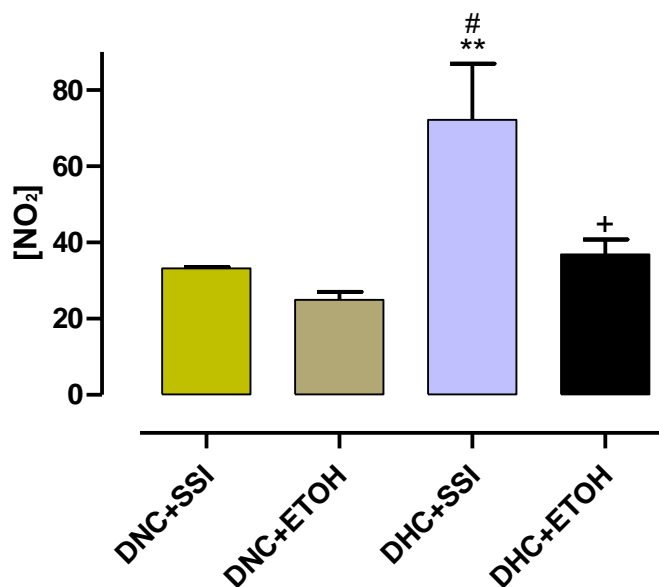


Figura.20: ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni con $p < 0.05$
No presenta comparación significante $p < 0.0057$

Tabla 10: Concentración de nitritos de hígado por grupos.

Grupo	NITRITOS HIGADO			
	DNC S.S	DNC EtOH	DHC S.S	DHC EtOH
Media \pm ES	33.23 \pm 0.330	24.93 \pm 2.096	72.22 \pm 14.75	36.84 \pm 3.925

Tabla 11: La lectura de los datos de la tabla se toma la referencia el 100% sobre el valor de los datos de un incremento o decremento.

Grupo	NITRITOS HIGADO %			
	DNC S.S.I	DNC EtOH	DHC S.S.I	DHC EtOH
DNC S.S.I	100	75.02	217.31	110.87
DNC EtOH	133.29	100	289.67	147.78
DHC S.S.I	46.01	34.52	100	51.01

DHC EtOH	90.19	67.66	196.01	100
----------	-------	-------	--------	-----

5.3.4 PÁNCREAS

La prueba para evaluar la concentración de nitritos no arrojó datos significantes, los grupos evaluados mostraron concentraciones semejantes entre grupo DNC y DHC administrados con EtOH y lo mismo con los grupos con S.S.I, figura 21, en la tabla 12 se muestran dichos resultados. Las diferencias porcentuales respecto al grupo control DNC S.S.I tuvo diferencias en la cual el grupo DNC EtOH tuvo un 100.51% de incremento, los grupos problema DHC S.S.I un 8.86% de incremento y el grupo DHC EtOH con un 55.07% de incremento.

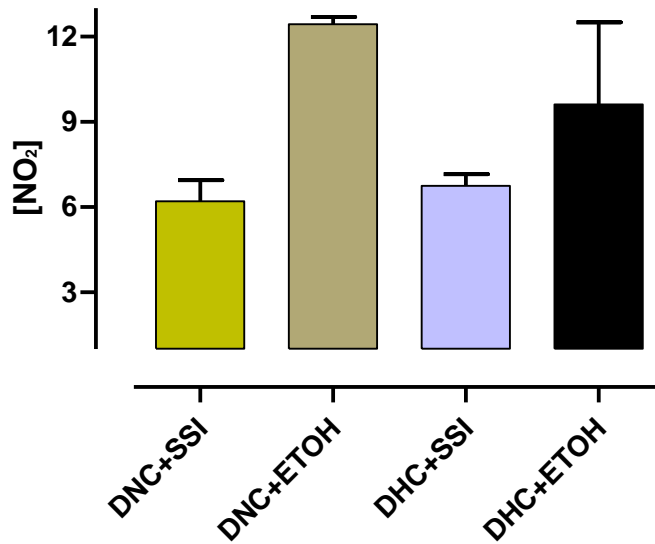


Figura. 21: ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni con $p < 0.05$
No presenta comparación significativa $p < 0.2740$

Tabla 12: Concentración de nitritos de páncreas.

	NITRITOS PÁNCREAS			
Grupo	DNC S.S	DNC EtOH	DHC S.S	DHC EtOH
Media ± ES	6.204 ± 0.742	12.44 ± 0.259	6.754 ± 0.403	9.621 ± 2.889

Tabla 13: El 100% es la referencia que indica la diferencia entre grupos en un incremento o decremento sobre cada una de las concentraciones obtenidas de los otros grupos.

	NITRITOS PANCREAS %			
Grupo	DNC S.S	DNC EtOH	DHC S.S	DHC EtOH
DNC S.S	100	200.47	108.86	155.08
DNC EtOH	49.88	100	54.30	77.36
DHC S.S	91.85	184.15	100	142.46
DHC EtOH	64.48	129.26	70.19	100

5.4 EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE ASTROCITOS Y POR ADMINISTRACION DE ETANOL DURANTE EL SM

Al término de las 23 semanas de la inducción del SM, la administración de alcohol y pruebas conductuales, los roedores de experimentación se les práctico eutanasia, obteniendo sus cerebros para realizar cortes coronales, esto para obtener lectura de las regiones CA1 y NPV los cuales fueron teñidos con marcadores DAPI y RODAMINA para realizar imágenes las cuales fueron tomadas con objetivos de 20X y 40X, una vez obtenidas todas las imágenes se utilizó el software ImageJ para obtener la cuantificación de las células expresadas.

La figura 22, muestra la anatomía que tienen los astrocitos en sus diferentes etapas de su expresión según el grado de inflamación. En la fila A se observan los astrocitos individualmente antes, durante y después de su alteración fisiológica, en la fila B se muestran los astrocitos con un objetivo a 40X en la expresión de los diferentes grupos. Comparándola con la fila A la morfología son similares:

- Ramificada – DNC S.S.I: La expresión de los astrocitos es casi nula.
- Hiper-ramificada – DNC EtOH: Se observan células con una morfología ligeramente más elevada.
- Tupida – DHC S.S.I: El astrocito se observa con mayor volumen y se destacan pequeñas ramificaciones y el comienzo de una inflamación sobresaliente ya que se muestran 3 ramificaciones mayores formando una Y.
- Ameboide – DHC EtOH: El astrocito está en su máxima inflamación ya que esta carece de ramificaciones y su expresión es mayor, no presenta una morfología uniforme.

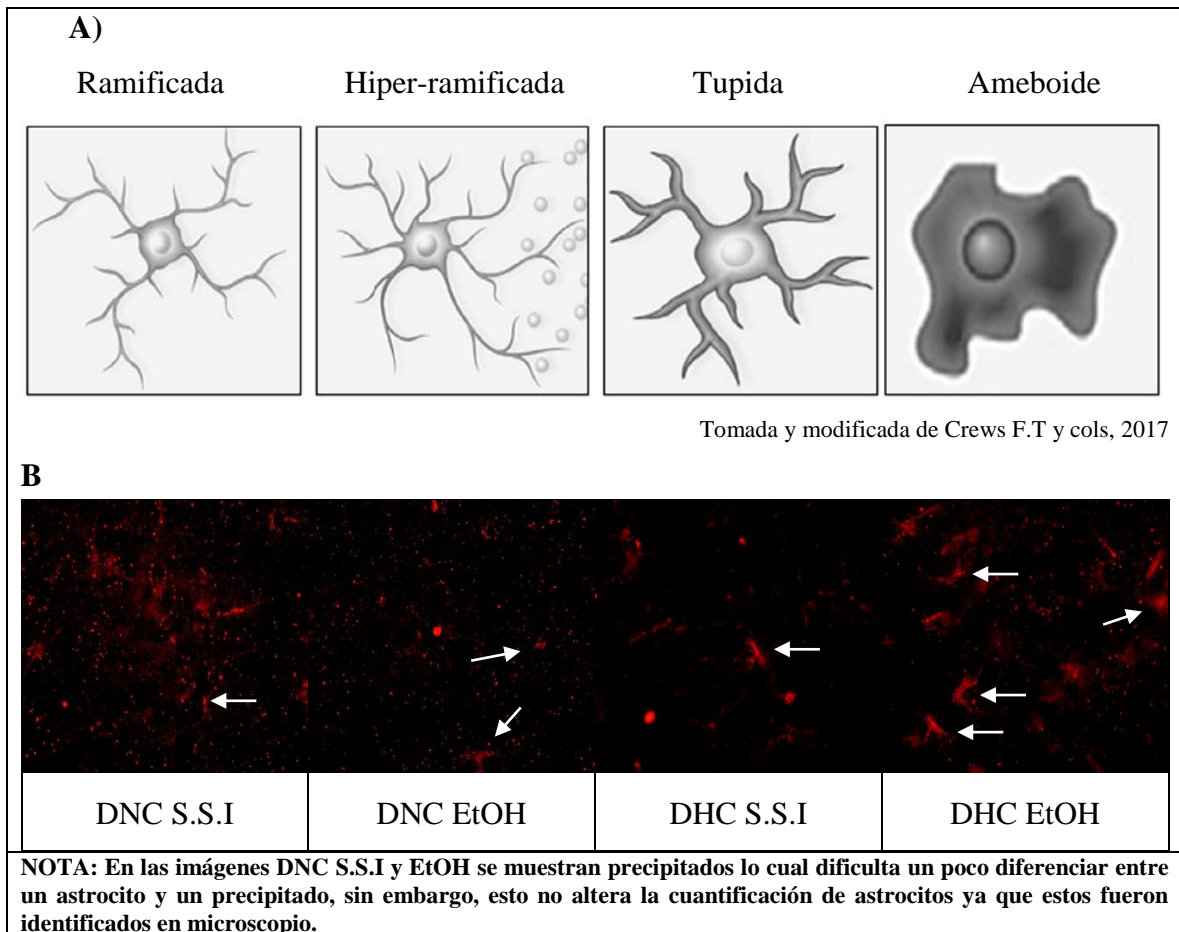


Figura. 22: La expresión de astrocitos en área CA1 nos muestran que la presencia de ROS desencadena cascadas de señalización resultando así la inflamación celular.

A) Muestra la morfología de las células microgliales en sus diferentes etapas.

B) El resultado de las inmunohistoquímicas realizadas de cada grupo y el número de células por cada grupo

5.4.1 Inmunohistoquímica del área CA1

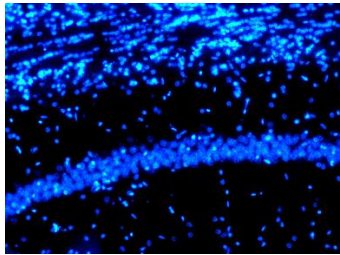
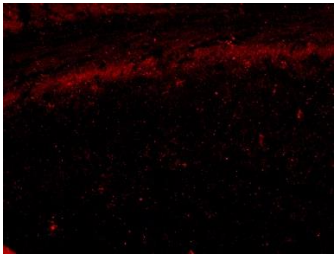
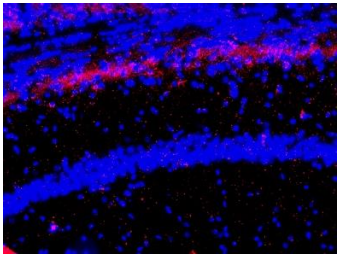
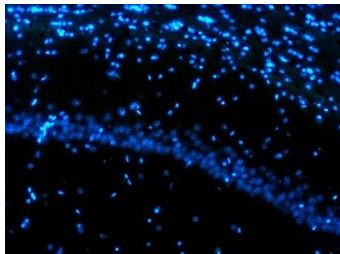
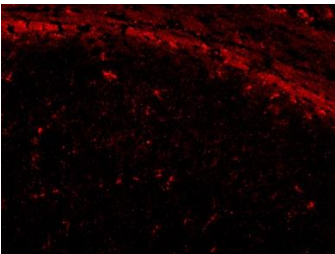
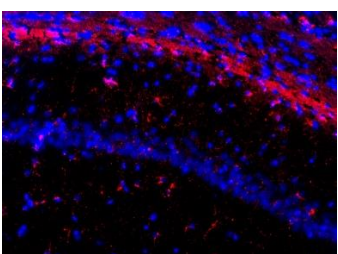
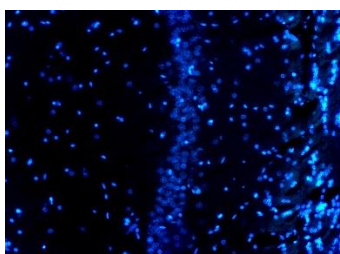
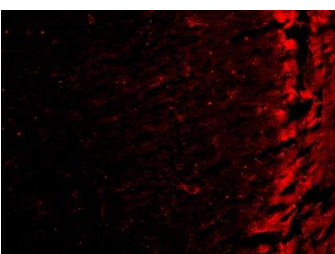
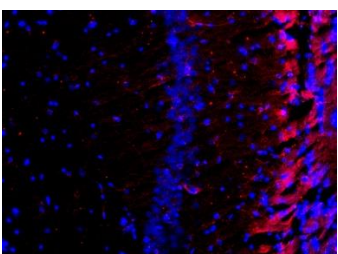
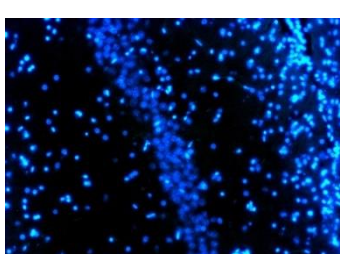
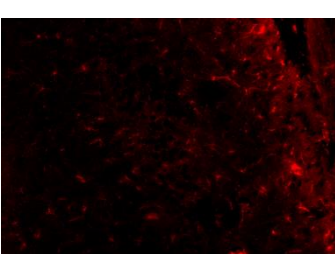
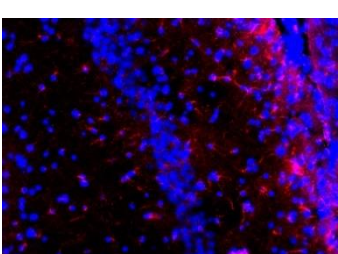
	NUCLEOS	ASTROCITOS	Co-localización
DNC S.S.I	N1 	A1 	Co1 
DNC EtOH	N2 	A2 	Co2 
DHC S.S.I	N3 	A3 	Co3 
DHC EtOH	N4 	A4 	Co4 

Figura. 23: Fotomicrografías con objetivo 20X de cada grupo experimental con los diferentes marcadores, se muestran en la primera columna los núcleos marcados con DAPI, en la segunda columna la expresión de células micro gliales (marca roja) y en la tercera columna la co-localización de los núcleos.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la expresión de astrocitos sobre la inflamación durante el consumo de EtOH en roedores con SM, se realizó una inmunofluorescencia en el área CA1, Figura. 23. En la cual en la columna de ASTROCITOS revela la expresión de los astrocitos de los cuales el número de astrocitos cuantificados incrementa según cada grupo.

Los resultados cuantificados en la gráfica de la figura 24 da un total células de forma creciente, es decir, grupo DNC S.S vs DNC EtOH tiene un aumento de 89.47%, un aumento más notable en el grupo DHC S.S con un 95.06% y con un 98.73% de incremento en el grupo DHC EtOH el cual es el grupo con mayor número de expresión (Tab. 14) ya que se encontraba en condiciones de una DHC + EtOH el cual desarrollaba radicales libres y así aumentar la expresión celular.

Se obtuvieron cambios significativos todos respecto al grupo DHC EtOH.

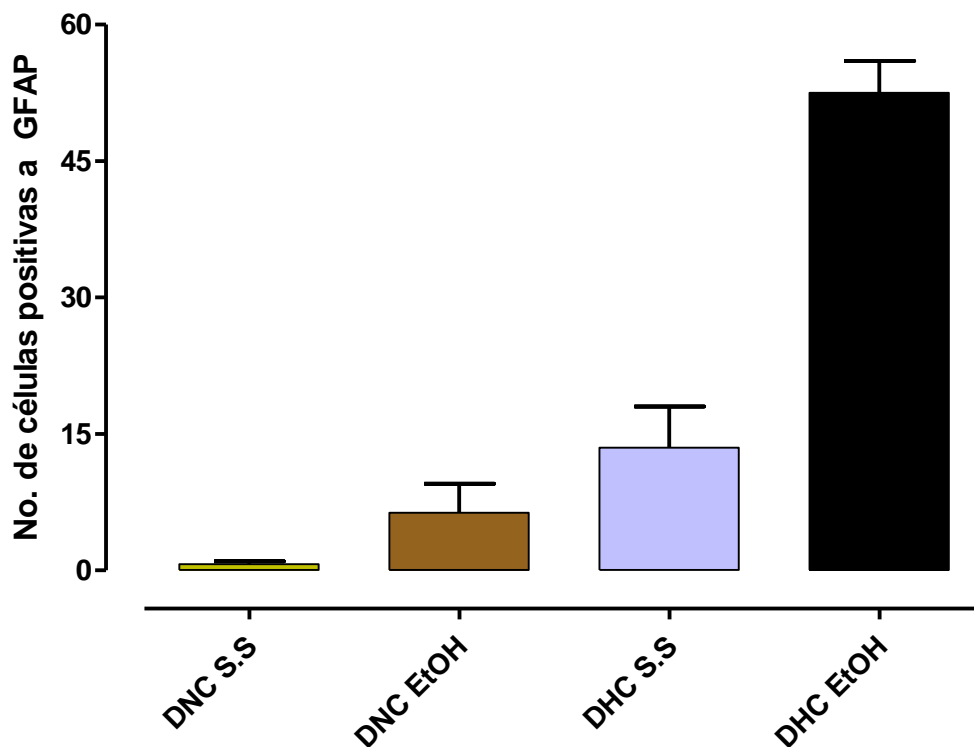


Figura. 24: ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni con $p < 0.05$
Se realizó una ANOVA de una vía múltiple de Bonferroni con un nivel de significancia de $p < 0.0001$ ***.
DNC S.S.I, DNC EtOH y DHC S.S.I vs DHC EtOH.

Tabla 14: Cuantificación de células microgliales de CA1

Grupo	NUMERO DE CELULAS			
	DNC S.S.I	DNC EtOH	DHC S.S.I	DHC EtOH
Media ± ES	0.6667 ± 0.333	6.333 ± 3.18	13.5 ± 4.5	52.5 ± 3.5

5.4.2 Inmunohistoquímica del área NPV

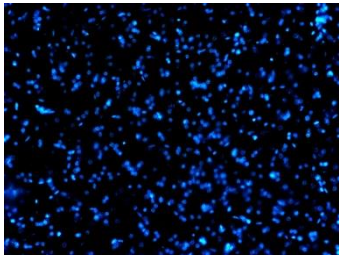
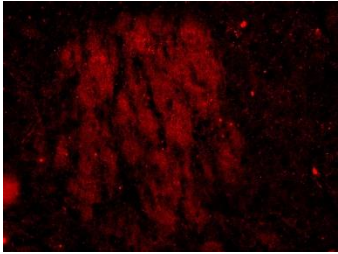
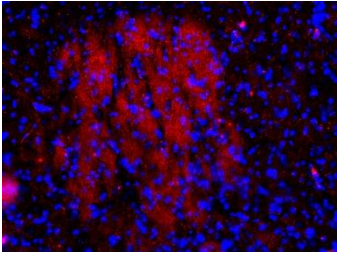
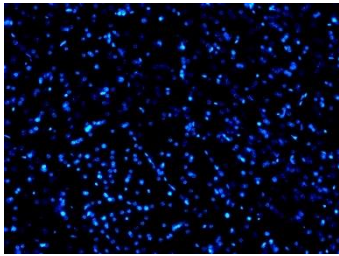
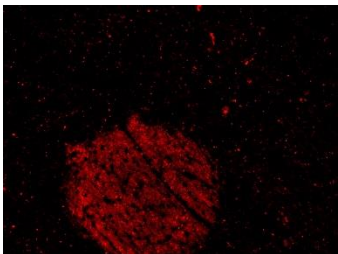
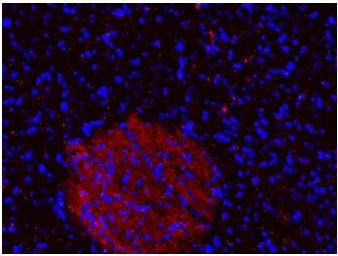
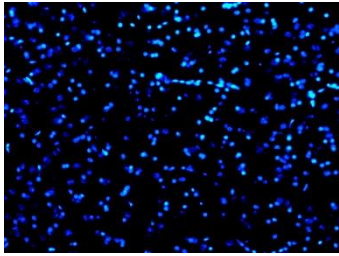
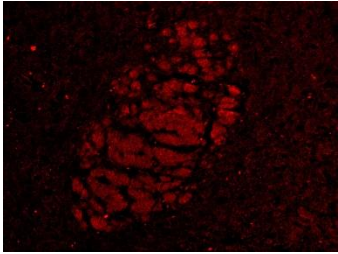
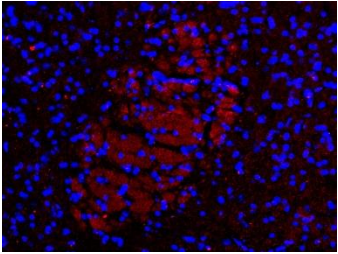
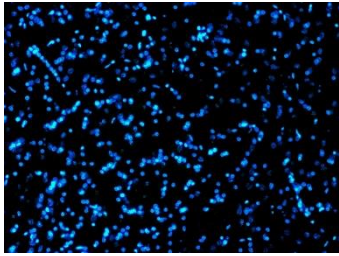
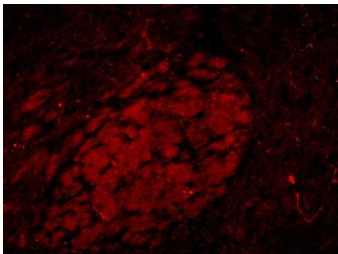
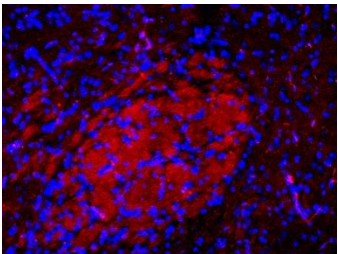
	NUCLEOS	MICROGLIA	CO-LOCALIZACIÓN
DNC S.S.I	N1 	M1 	Co1 
DNC EtOH	N2 	M2 	Co2 
DHC S.S.I	N3 	M3 	Co3 
DHC EtOH	N4 	M4 	Co4 

Figura. 25: las fotomicrografías tomadas con objetivo 20X, la primera columna están los núcleos marcados con DAPI y en la segunda el NPV de cada grupo con la expresión celular. En la tercera columna la Co-localización de la expresión final celular

Los efectos causados por el SM y el consumo de etanol expresaron células las cuales en la Figura 25 se muestran notablemente, cada grupo mostro una cuantificación de células tabla 15 las cuales tuvieron diferencias entre DNC S.S vs DNC EtOH tiene un aumento de 91.43%, DHC S.S respecto a DNC S.S hubo un incremento del 93.75% y por ultimo un aumento del 96.29% sobre el grupo control DNC S.S.

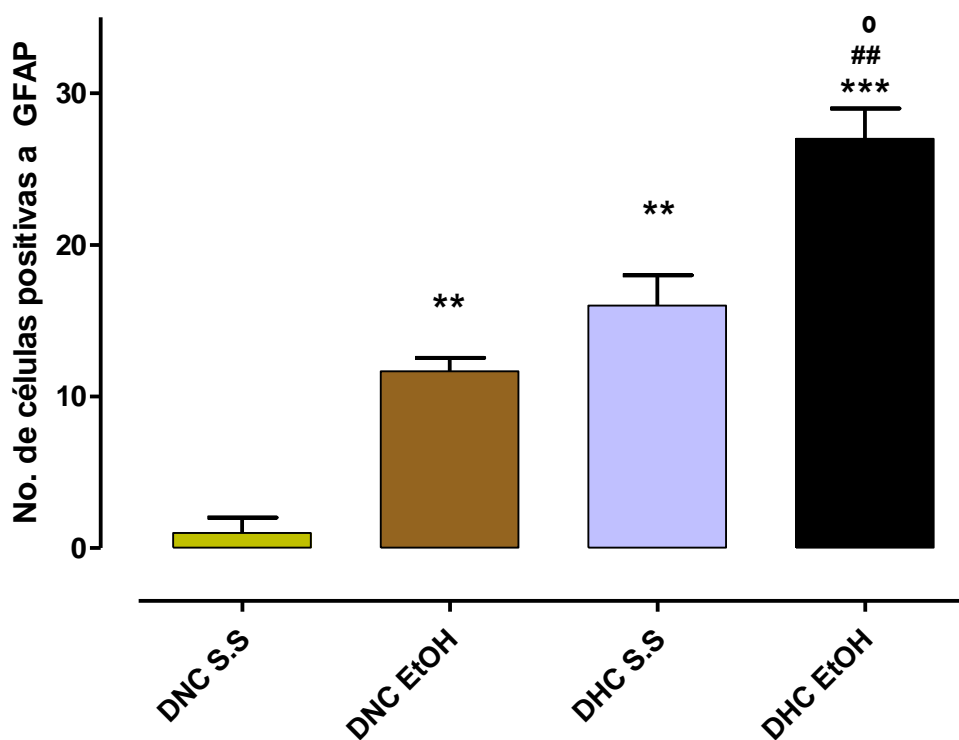


Figura. 26: ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni con $p < 0.05$. Se realizo una ANOVA de una vía múltiple de Bonferroni con un nivel de significancia de $p < 0.0001$ ***. DNC S.S vs DNC EtOH**, DNC S.S vs DHC S.S**, DNC S.S vs EtOH***, DNC EtOH vs DHC EtOH## y DHC S.S vs DHC EtOH °.

Tabla 15: Cuantificación de células microgliales de CA1

Grupo	NUMERO DE CELULAS			
	DNC S.S	DNC EtOH	DHC S.S	DHC EtOH
Media ± ES	1 ± 1	11.67 ± 0.8819	16 ± 2.0	27 ± 2.0

6 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió el efecto producido por el alcohol en ratas alimentados con una DNC y DHC. Se demostró que se ejerce un efecto en los procesos de ansiedad y depresión incrementando al combinar dichas características, además de observar un aumento en la inflamación y estrés oxidativo.

El consumo de alcohol está relacionado con la adiposidad, es un potencial para promover el aumento de peso e inhibe la oxidación de las grasas lo cual sugiere que el consumo frecuente de alcohol podría conducir al almacenamiento de grasa a largo plazo. Yeomans analizo 17 estudios de los cuales diez mostraron una mayor ingesta de alimentos después del consumo de alcohol (Traversy G. & Philippe J., 2015). El consumo constante de una DHC mostro que durante el periodo de 150 días hubo una ligera diferencia sobre el grupo de DNC figura 9 y tabla 1, la cantidad difiere en el descenso del grupo de DHC ya que en las últimas semanas 8 de las ratas fueron sometidos a consumo de EtOH, lo que es posible que este cambio fue fundamental para tener una diferencia, el mismo cambio ocurre en el IMC figura 10 y tabla 2. Sin embargo, durante el consumo de las dietas DNC y DHC hubo un constante aumento de peso para ambos grupos durante los primeros 90 días provistos para el desarrollo del síndrome metabólico, a partir del día 91 durante y hasta el día 150 el consumo de S.S y EtOH hubo un cambio notable en el peso de los diferentes grupos en la figura 11 se muestra que el consumo de una DHC y el constante consumo de EtOH conllevan un aumento de peso a diferencia de una DNC que mantiene un índice de peso bajo. Aún no está claro si el consumo de alcohol es un factor de riesgo para el aumento de peso. A pesar de, hay estudios realizados hasta el momento encontrado asociaciones positivas, negativas o nulas. No obstante, dado que las asociaciones positivas entre el alcohol y el aumento de peso se encontraron principalmente en estudios con datos sobre niveles más altos de consumo de alcohol, es posible que los bebedores intensos solo experimenten un efecto sobre el aumento de peso o la adiposidad abdominal. Sin embargo, se sabe que el alcohol es utilizado como fuente de energía por el cuerpo y debe tomarse en cuenta en la ecuación del balance energético. También se sabe que la energía del alcohol cuenta como una forma de combustible

metabólico, pero su efecto termogénico es intermedio, es decir, entre los carbohidratos y las proteínas (Sayon C. 2011).

La energía derivada del alcohol debe impactar en el sistema de control del apetito a través de los mecanismos de retroalimentación asociados con el balance energético en general. El alcohol inhibe la oxidación de las grasas, lo que sugiere que el consumo frecuente de alcohol podría conducir a ahorrar grasa y, por lo tanto, a aumentar la grasa corporal a largo plazo (Traversy G. y Philippe J., 2015; Yeomans M.R y cols., 2003). En la figura 11 se muestra la diferencia de los cuatro grupos, hay una relación entre los grupos DNC EtOH y el DHC EtOH, ambos grupos al ser administrados con EtOH mantuvieron un peso promedio respectivamente, por encima de los grupos control de DNC y DHC administrados con S.S.I, ya que la principal fuente de energía fue el EtOH por lo cual la DNC y DHC los carbohidratos solo fueron absorbidos y alojadas en tejido adiposo. La activación del ineficaz sistema hepático microsomal oxidante de etanol (MEOS). El MEOS se induce mediante la ingesta crónica de alcohol, y el nivel de inducción aumenta con el aumento de la ingesta. La oxidación del alcohol a través del MEOS produce menos ATP que la oxidación a través del alcohol deshidrogenasa, utilizando la energía de la ingesta de alcohol principalmente para mejorar la producción de calor (Traversy G. y Philippe J., 2015). Por lo cual, el aumento de peso en el grupo DHC EtOH aumento a partir de la semana 19 a la 23, y en DNC EtOH aumento de la semana 19 a la 21 sin embargo, tuvo un descenso ya que la dieta no contenía la misma concentración de carbohidratos por lo cual este se ve disminuida.

La obesidad es una enfermedad multifactorial caracterizada por la acumulación anormal o excesiva de grasa. La obesidad es causada por un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y gastadas, que a menudo se asocia con una mayor ingesta de alimentos densos en energía con altos niveles de grasa y azúcar con una mayor inactividad física, que se asocia con un estilo de vida sedentario creciente. Se debe considerar la variabilidad en la composición de grasas y / o azúcar en la dieta, ya sea que la dieta esté disponible de manera intermitente o continua, y la duración de la exposición a la dieta generalmente evoca diferencias observables en los resultados metabólicos y de comportamiento (Baker D.K y cols., 2017; Zanini B.D.P y cols., 2017). En el grupo DNC S.S.I y el grupo DHC S.S.I hay una similitud en pesos tabla 3, en este grupo la energía requerida por la rata se obtenía directamente de las dietas DNC y DHC ya que no fueron expuestas a otra fuente de energía,

de tal forma que los carbohidratos de ambos grupos era metabolizada normalmente por lo cual el peso se mantuvo constante durante las semanas 15 a la 21 con un aumento en el grupo DNC en la semana 19 a la 21, sin embargo, los cambios más notorios para ambos grupos fueron de la semana 21 a la 23, ya que el grupo DNC disminuyo su peso y DHC aumento. Se ha demostrado que las ratas que consumen una dieta alta en calorías reproducen biomarcadores bioquímicos comúnmente utilizados en el diagnóstico del SM, además de obesidad con aumento de la circunferencia abdominal y, como consecuencia IMC y aumento de la adiposidad. Los factores provocantes del SM conllevan a un aumento del estrés oxidativo crónico correspondiente a un exceso de las ROS como resultado del desequilibrio de la producción y eliminación de las ROS (Treviño S. y cols., febrero 2017, Carrier A. diciembre 2016). Durante la prueba basal los grupos mostraron una conducta similar, después de 15 días y hasta el día 60 la diferencia del grupo DHC EtOH figura 13, mantuvo un incremento en la inmovilidad sobre los otros grupos, dado que la dieta involucra el desarrollo de SM el cual provoca un aumento de estrés oxidativo que genera una inflamación y una muerte celular más rápida conjunto con la administración de alcohol genera un aumento de la inflamación ya que el al metabolizarse el etanol genera radicales libres aumentando así el estrés oxidativo. Sin embargo, el comportamiento de los tres grupos del día 0 al 45 fue significativo ya que mantuvieron una conducta regular a diferencia del grupo DHC EtOH teniendo entre estos días variantes entre los días 0 al 15 en cambio el grupo DNC S.S no tuvo una diferencia durante el periodo de tiempo, el grupo DNC EtOH disminuyo su inmovilidad esto nos indica que su comportamiento de supervivencia aumento y que no muestra daños neurológicos como en el grupo DHC EtOH, a partir del día 15 al 45 ambos grupos DNC S.S y DNC EtOH mantuvieron el mismo comportamiento pero a partir del día 45 al 60 el grupo DNC S.S tuvo un aumento de tiempo inmóvil caso contrario con el grupo DNC EtOH que tuvo un ligero descenso en su comportamiento, en cambio, en el grupo DHC S.S tuvo un descenso desde el día 0 al 45 lo que indica que a pesar de que este inducido el SM no complica la dificultad de reacción de supervivencia ya que no está influenciada bajo el efecto alcohólico como en el grupo de DHC EtOH.

Existe un reconocimiento creciente de que la mala calidad de la dieta está asociada con una alta prevalencia de trastornos del estado de ánimo y ansiedad. La depresión y la ansiedad son afecciones comórbidas comunes abuso del alcohol. Los criterios para definir los trastornos

del estado depresivo y ansiedad son, por nombrar algunos, la anhedonia, los trastornos del sueño, la fatiga, pérdida de peso o aumento o disminución o aumento del apetito, retraso psicomotor o agitación (Abelaira H.M y cols., 2013; OMS 2020) Las conductas realizadas para cuantificar el estado de ansiedad y depresivo en las ratas fueron registradas en los modelos TSC, PCA y veces de exploración por cuadro central en las gráficas de la figura 13,15 y 17 nos comprueban que el consumo de EtOH y el SM generan una conducta negativa a largo plazo. En la figura 13 TSC el grupo DHC EtOH muestra mayor tiempo de inmovilidad sobre los otros 3 grupos, el cual tiene resultado significativo DHC S.S vs DHC EtOH ya que los grupos con una DNC no presentaron cambios significativos. A pesar de ello a partir del día 45 al 60 estos grupos tuvieron una tendencia a cambios. En PCA hubo un notable cambio durante la 1 a la 5, en la figura 15 A. se analizaron los datos mostrando un descenso constante en los grupos de DHC, su análisis se basó en la figura 15 B. en la semana 1 la actividad es similar la cual se toma como basal, al finalizar, la última prueba de la semana 5 la actividad vario según el grupo: el grupo control DNC S.S.I mantuvo su actividad normal, el grupo DNC EtOH disminuyo su actividad ligeramente, caso contrario en el grupo DHC S.S.I su actividad disminuyo respecto al grupo control, sin embargo, el grupo DHC EtOH tuvo una diferencia del 63.10% respecto al grupo control.

La actividad en número de veces de exploración por cuadro central se observa que hay una gran diferencia entre la semana 1 y la 5 disminuyendo la actividad en grupo de DHC S.S.I y EtOH. En la figura 17 A. se muestra el movimiento de los grupos con cambios durante la semana de las pruebas, sin embargo, al término de la prueba en la semana 5 la actividad disminuyo notablemente en los grupos administrados con EtOH figura 17 B. el grupo DHC EtOH en la semana 1 tuvo una actividad mayor en su estado ansiolítico el cual junto con su depresión mantienen la misma actividad, en la semana 5 los grupos administrados con EtOH no muestran actividad sobre el cuadro central de esta prueba.

El análisis de la correlación entre la gravedad de los síntomas de EtOH y SM demostraron marcadores de estrés oxidativo en la producción de ROS (Kolik L.G. y cols., 2016; Meo S.D. y cols., 2016) aumentando así la concentración de nitritos en corteza, hipocampo y estriado. En las diferentes áreas los niveles de NO se vieron en mayor concentración en el grupo DHC EtOH, esto es que una DNC no se ve afectada, salvo si esta se ve afectada con un constante nivel de consumo de EtOH el cual la concentración de NO aumenta, cambiando la conducta

de dicho grupo ya mencionado anteriormente. El consumo de una DHC azumado el consumo de EtOH conlleva a un alto grado de NO detallado en la figura 18 lo que implica que a mayor consumo de dietas altas en calorías y el constante consumo de EtOH desarrollaran mecanismos para la expresión de NO.

El abuso de alcohol causa una desregulación del sistema inmune innato en parte a través de la liberación de agonistas endógenos de TLR (Coleman jr. L. G. y cols., 2017). Los TLR inician una cascada de señalización de citosinas proinflamatorias las cuales están relacionadas a una vía dependiente de MyD88, TRAF6 es un factor indispensable que se ubiquitina para reclutar a los complejos TAK1 e IKK. Una vez que IKK es fosforilado, inducirá la activación y translocación al núcleo de NF- κ B para promover la producción de citocinas proinflamatorias. A su vez, TAK1 activa a las MAPK, culminando en la inducción de la expresión de moléculas coestimuladoras, quimiocinas y citocinas. La vía independiente de MyD88 es iniciada por TRIF y TRAM, que provocan la activación de TKB1 y su capacidad de fosforilar a los factores IRF3 y 7 para su translocación homodimérica al núcleo, esta vía puede también inducir la activación de NF- κ B (Eduardo V y Cols, 2012). La inflamación representa un proceso biológico complejo y estrictamente regulado la inflamación es causada en parte por la liberación de citocinas, incluyendo interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y proteína quimioatrayente de monocitos. 1 (MCP-1). Como resultado, las citocinas elevadas y la inflamación correspondiente contribuyen directamente a las dietas hipercalóricas tienen más probabilidades de inducir inflamación. La iNOS es indetectable en condiciones basales y se reagrupa en respuesta a diversos estímulos, como las citocinas inflamatorias (Michalska A.G. y cols., 2013). La cuantificación NOS en cerebro el cual está en mayor concentración en el grupo DHC EtOH. el análisis de la correlación entre la gravedad de los síntomas de consumo de alcohol y de una DHC los marcadores de estrés oxidativo en las diferentes zonas cerebrales indicaron que el estrés oxidativo implica el desarrollado de trastornos como la depresión, ansiedad por los altos niveles de radicales libres derivados de distintos mecanismos, los cuales el efecto sobre las diferentes zonas cerebrales se ve comprometida ya que a mayor concentración de estrés oxidativo mayor serán los daños.

El daño cerebral inducido por etanol incluye la reducción del volumen cerebral, la pérdida de neuronas corticales, el aumento de la microglía, la astrogliosis reactiva y la formación de

cicatrices gliales. Los astrocitos apoyan la salud neuronal a través del apoyo estructural y metabólico, incluido el mantenimiento de la homeostasis del glutamato. Se postula que la neurotoxicidad como consecuencia del abuso crónico de alcohol es el resultado de la disminución de la función inhibitoria GABAérgica concomitante con una función glutamatérgica excitadora aumentada como consecuencia de la neuroadaptación, lo que resulta en estrés oxidativo, inflamación y daño cerebral citotóxico. Los astrocitos protegen las neuronas de la excitotoxicidad del glutamato y el estrés oxidativo al eliminar el glutamato del espacio celular adicional a través de transportadores de aminoácidos excitadores dependientes de sodio (EAAT). Dos de los cinco transportadores de glutamato, GLAST (equivalente humano EAAT1) y GLT-1 (EAAT2), se expresan predominantemente por astrocitos y son responsables de la mayor parte de la absorción de glutamato en el cerebro. Los niveles extracelulares elevados de glutamato provocan la inhibición de la producción de glutatión y la activación persistente de los receptores de glutamato, incluidos los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), que pueden ser un mediador particularmente importante del daño cerebral inducido por etanol. Se observa una pequeña porción de estos individuos, se pueden observar síntomas leves a moderados del síndrome de abstinencia de alcohol, como ansiedad. Las altas concentraciones de glutamato en el espacio extracelular también pueden conducir a un daño neurotóxico excitotóxico mediado, al menos en parte, por la acumulación de óxido nítrico. Aunque se han observado cambios en la señalización de glutamatos en alcohólicos durante la desintoxicación y en los roedores durante la abstinencia, el papel específico de la astrocitosina que media los efectos de la exposición crónica al alcohol en el SNC es relativamente inexplorado. La región CA1 del hipocampo de la rata es altamente susceptible a los efectos excitadores y neurodegenerativos de la abstinencia aguda de etanol. Si bien esta mayor sensibilidad de la región CA1 al insulto excitotóxico puede estar relacionada con una mayor densidad de receptores NMDA (Clare J. y cols., 2015; Brambilla L. y cols., 2013; Prendergast M. A. y cols., 2004). La neuroinflamación expresada por cada grupo del tratamiento se observa en la figura 24, la concentración de los grupos en región CA1 se muestran en figura 23. La inmunohistoquímica en esta área en el grupo DNC S.S.I A1 la expresión es mínima ya que no hay un factor que exprese inflamación, el grupo DNC EtOH A2 tiene un aumento en el número de células expresadas ya que el constante consumo de etanol conlleva al aumento de ROS lo cual deriva la neuro-inflamación. Por lo contrario,

la expresión de la neuro-inflamación en el grupo DHC S.S.I A3 es mayor a comparación de su grupo control, ya que en este grupo sometido a dieta hipercalórica desarrollo un incremento de ROS. En el grupo DHC EtOH A4 la expresión es más notoria, el consumo constante de etanol y el alto consumo de calorías desarrollan una inflamación celular generando de esta manera daños morfológicos en astrocitos.

El PVN del hipotálamo es un importante sitio para la integración de la actividad nerviosa simpática. Se sabe que el PVN desempeña un papel clave en la regulación central del tono simpático en la salud y la enfermedad. El PVN está involucrado en afecciones patológicas originadas por la simpatoexcitación, como hipertensión, insuficiencia cardíaca, diabetes, obesidad y síndrome metabólico, siendo un núcleo integrador importante para las funciones autonómicas y neuroendocrinas. Entre las funciones PVN se encuentran la regulación de la ingesta de alimentos, el reflejo aferente adiposo (AAR). Ha habido un enfoque particular en el papel regulador del óxido nítrico dentro de la PVN. El óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) es la enzima responsable en gran medida de la producción de óxido nítrico en las neuronas y se expresa en varias regiones cerebrales importantes en el control autonómico, incluido el PVN. El nNOS es altamente expresado por las células del PVN, el punto de convergencia para el sistema simpaticoadrenal, el eje HPA y el sistema hipofisario hipotalámico (Michalska A.G. y cols., 2013; Cruz J. C. y cols., 2008; McBryde F. D. y cols., 2017; Cruz J. C. y cols., 2015). EL NPV es una de las zonas afectadas por la alta concentración de ROS desarrollando así nNOS, por lo que el daño es ampliamente claro, en nuestras pruebas se desarrollaron diferentes anomalías, el grupo control DNC S.S.I no mostro ningún tipo de afecciones, tanto conductuales, trastornos alimenticios, ansiedad y depresión, y su conteo de células fue prácticamente nula, la concentración de nNOS fue muy baja a comparación de los grupos problema lo cuales mostraron alteraciones: el grupo DNC EtOH la cuantificación celular fue de 91.43% sobre el grupo control, la concentración de NO provoco un aumento celular reflejando así desarrollando así síndrome metabólico lo cual hizo un aumento en ROS provocando así un aumento en el nNOS por lo cual la su ingesta alimentaria se vio afectada.

Los grupos DHC la concentración de nNOS registrada nos indica que las conductas en ambos grupos fueron elevadas ya que la expresión celular se vio afectada, el grupo administrado con EtOH elevo el conteo celular ya que las ROS generadas por el SM y el constante consumo

de EtOH esto provocando trastorno alimentario, su estado de depresión y ansiedad aumentaron respecto al grupo control.

Además, el NPV es un importante sitio de integración de actividad simpática y conexiones a áreas como el SNC que involucra la modulación autónoma de la función cardiovascular. Se ha demostrado la sobreexpresión y una mayor actividad de iNOS en el miocardio de animales y pacientes con diversas formas de insuficiencia cardíaca y los beneficios de la inhibición de iNOS en la función cardíaca, se descubrió que el aumento de la actividad de iNOS miocárdico es responsable de la contractilidad miocárdica deprimida y la hiporeactividad β -adrenérgica en ratas con insuficiencia cardíaca de sobrecarga de volumen. Las fuentes adicionales de aumento de la producción de NO en el corazón defectuoso son nNOS y eNOS.

El NO generado por eNOS en corazón relaja los vasos sanguíneos y mantiene la normalidad, presión arterial. El NO activando la vía de transducción de señal de guanililasa soluble (sGC) -cGMP media varios efectos fisiológicos / beneficiosos en el sistema cardiovascular, incluyendo vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria, efectos antiinflamatorios, antirremodelados y antiapoptóticos. Bajo condiciones patológicas asociadas con un aumento del estrés oxidativo y la inflamación, Los mecanismos que conducen a la insuficiencia cardíaca son de origen múltiple e incluyen infarto de miocardio, cardiopatía isquémica aguda y crónica, miocarditis, cardiomiopatía, hipertensión por mencionar algunas. Estas enfermedades provocan un desajuste entre la carga aplicada al corazón y la energía necesaria para la contracción, lo que conduce a un desacoplamiento mecano-energético. Mediadores secundarios como angiotensina II (Ang II), noradrenalina (NA), endotelina (ET) y citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6), en conjunto con el estrés oxidativo y nitrosativo, actúan directamente sobre el miocardio o indirectamente a través de cambios en las condiciones de carga hemodinámica para causar disfunción endotelial y miocárdica, remodelación cardíaca y vascular con hipertrofia, fibrosis, dilatación cardíaca y necrosis miocárdica, que eventualmente conducen a insuficiencia cardíaca. La remodelación adversa y el aumento de la resistencia periférica agravan la insuficiencia cardíaca grave. (Meo S.D. y cols., 2016; Cruz J. C. y cols., 2008; Pacher P., Beckman J. S. y cols., 2007; Pacher P., Schulz R. y cols., 2005). En nuestros resultados de nitritos nos muestra que la concentración alta desarrolla apoptosis celular significativamente lo cual desarrollan diferentes desordenes cardiacos, basándonos solo en la concentración de NO se demuestra que el grupo control no tiene

concentraciones altas considerando que sea concentraciones basales, partiendo de ello los diferentes grupos mantuvieron una concentración por debajo del grupo control, sin embargo, el grupo con DNC EtOH obtuvo una concentración mayor por lo que es probable que este grupo desarrollo las diferentes patologías ya mencionadas por la concentración alta en NO. Las enfermedades crónicas del hígado a menudo van acompañadas de un aumento del estrés oxidativo, independientemente de la causa de la disfunción hepática. Un consumo excesivo de alcohol resulta en una mayor actividad metabólica que eleva el ROS y la lesión hepática. El estrés oxidativo puede conducir a la degradación celular de proteínas, lípidos y ADN. Un consumo excesivo de alcohol resulta en una mayor actividad metabólica que eleva el ROS y la lesión hepática. Las ROS participan en la respuesta fibrogénica del hígado y contribuyen a la isquemia / regeneración, necrosis y apoptosis. Estas modificaciones dan como resultado una expresión génica alterada y daño hepático progresivo. Además, ROS puede ser producido por el retículo endoplásmico en el hígado a través de las enzimas del citocromo P450 en los niveles de macrófagos y neutrófilos. Uno de los mecanismos que conducen al estrés oxidativo es la modulación de la expresión de proteínas bajo estrés de H₂O₂. Esta alteración expone al hígado al estrés oxidativo severo, lo que resulta en apoptosis de hepatocitos. Los estudios han demostrado que el etanol puede provocar un aumento significativo de los niveles de ROS mitocondriales en los hepatocitos. La oxidación del etanol involucra al menos tres vías enzimáticas distintas. El alcohol deshidrogenasa (ADH) oxida el etanol a acetaldehído y luego es oxidado al acetato por el aldehído deshidrogenasas (ALDH) en las mitocondrias. El acetaldehído daña el hígado al desencadenar directamente inflamación, remodelación de la matriz extracelular (MEC) y fibrogenesis. el acetaldehído estimula la señalización β -factor de crecimiento transformante (TGF) en las células estrelladas hepáticas que adquieren un perfil pro-fibrogénico y pro-inflamatorio. La oxidación del etanol también es promovida por el sistema oxidante de etanol microsomal (MEOS), la enzima citocromo P450, el citocromo P450 2E1 (CYP2E1) y la catalasa en los peroxisomas. Un consumo excesivo de alcohol resulta en una mayor actividad metabólica que eleva el ROS y la lesión hepática. Las ROS, como los iones de peróxido de hidrógeno y superóxido, generadas por CYP2E1 son responsables del perfil proinflamatorio de la lesión hepática relacionada con el alcohol al activar factores de transcripción sensibles a redox (NF- κ B) reclutar neutrófilos y otras células inmunes; aumentar el nivel de citocinas proinflamatorias circulantes; y contribuyendo a la

peroxidación lipídica asociada con la lesión hepática alcohólica. La inflamación hepática se establece para proteger a los hepatocitos de las lesiones, favorecer la reparación del daño tisular y promover el restablecimiento de la homeostasis, ejerciendo de hecho efectos hepatoprotectores. Sin embargo, las respuestas inflamatorias que son intensas se vuelven crónicas, están casi invariablemente acompañadas de una pérdida masiva de hepatocitos, causando daño irreversible al parénquima hepático. El estrés oxidativo se consideró un factor patológico clave de la progresión de la NAFLD. El consumo excesivo de alcohol, afecciones metabólicas sistémicas como la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) representa un espectro de enfermedad que abarca esteatosis simple y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico. El NO juega un papel importante en la progresión de enfermedades hepáticas. Las isoformas eNOS e iNOS son abundantes en el hígado. La iNOS se induce fácilmente tanto en la lesión hepática aguda como crónica e independiente del calcio está presente en los hepatocitos, las células Kupffer y estrelladas y los colangiocitos, mientras que la eNOS dependiente de calcio está presente en las células endoteliales (Brenner C. y cols., 2018; Farzaei M. H. y cols., 2018; Beloui O. S. y cols., 2019; Frau M. y cols., 2013; Leung T. M. y cols., 2011; Rocco A. y cols., 2014). El hígado es uno de los órganos mas afectados ya que se encarga de desintoxicar y de tal manera el daño que se provoque puede ser reversible o no, se sabe que una alta concentración de NO es susceptible a causar alteraciones celulares, sin embargo, en nuestra investigación el grupo que manifestó una concentración alta fue DHC S.S.I dándonos como resultado que el daño celular marcado en este grupo tiene un mayor daño en comparación de los otros grupo, además, como se ha demostrado en la literatura el etanol causa entre otras cosas cirrosis dado que la intoxicación es alta, en cambio en nuestros resultados la concentración de NO- no es alta respecto al grupo con S.S.I, se puede contemplar un daño lo cual necesitarían nuevas investigaciones para poder esclarecer un resultado comparativo.

El páncreas está formado por células de los islotes dispersas por todo el páncreas tienen una actividad endocrina al producir hormonas (insulina y glucagón) que regulan los niveles de glucosa en sangre. Estas células de los islotes se pueden subdividir en células α y β . Las células α producen glucagón, que eleva los niveles de glucosa en la sangre al estimular al hígado a metabolizar el glucógeno en moléculas de glucosa y liberar la glucosa en la sangre. Además, el glucagón estimula el tejido adiposo para metabolizar los triglicéridos en glucosa,

que luego se libera a la sangre. Por el contrario, las células β del páncreas producen insulina, que reduce los niveles de glucosa en sangre después de una comida al estimular la absorción de glucosa por el hígado, los músculos y los tejidos adiposos y al promover el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en estos tejidos. El consumo excesivo de alcohol puede inducir el desarrollo de inflamación del páncreas (pancreatitis), más comúnmente en las células acinares. Sin embargo, el aspecto inflamatorio de esta enfermedad también puede dañar las células de los islotes y, por lo tanto, el páncreas endocrino, y es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de páncreas, el desarrollo de diabetes tipo 2, también afecta la función de las células β pancreáticas desarrollando apoptosis que se asociaron con una disminución de la secreción de insulina. Se sugiere que la exposición al alcohol condujo a una baja regulación e inactivación de la enzima glucoquinasa, que actúa como un sensor de células β para los niveles de glucosa en sangre la cual está involucrada en el metabolismo de la glucosa que produce adenosina trifosfato intermediario de la secreción de insulina a la igual disminución de GLUT 2 en células β , así como reducción de síntesis de insulina. Un aumento del flujo glucolítico es seguido por el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y a su vez mayor producción de ATP en mitocondrias y un aumento en la relación ATP a ADP dentro del citoplasma. Esto promueve el cierre de los canales de K^+ sensibles al ATP (KATP), lo que a su vez disminuye el flujo de K^+ hiperpolarizante hacia afuera. Como resultado de estos cambios, se produce la despolarización de la membrana plasmática, seguida de la entrada de Ca^{2+} extracelular, un aumento del Ca^{2+} intracelular y la subsecuente secreción de insulina. El aumento del flujo del ciclo glucolítico como del TCA son necesarios para asegurar una secreción de insulina adecuada como respuesta a los niveles altos de glucosa en sangre. Sin embargo, cuando el aclaramiento de glucosa comienza a verse afectado debido a la resistencia periférica a la insulina, el aumento continuo del flujo glucolítico también puede aumentar la producción de ROS en las células β . En particular, el aumento de Ca^{2+} intracelular puede estimular tanto la generación mitocondrial de ROS como la activación de la proteína quinasa C (PKC), que a su vez conduce a la generación de superóxido y otras especies dependientes de NADPH oxidasa. Además, el aumento de las concentraciones de glucosa suprime la generación de superóxido en estas células. La cadena respiratoria mitocondrial es una fuente importante de ROS, en los complejos I y III dentro de la membrana mitocondrial interna donde se generan iones superóxido altamente reactivos

(O₂⁻) mediante reducción de electrones, al ser una especie cargada no puede cruzar la membrana, puede hacerlo mediante canales aniónicos. El superóxido se convierte en H₂O₂ por isoenzimas del SOD. AL ser una especie menos reactiva y sin carga, el H₂O₂ puede difundirse entre membranas a través de acuaporinas y convertirse en radicales (OH⁻). Además, la formación del peroxinitrito (ONO₂⁻) resulta de la reacción del superóxido con el radica NO⁻. Una fuente más de las ROS también es generadas por oxidorreductasas de membrana plasmática y citosólica que oxidan NADPH y producen directamente ROS a través de la reducción del oxígeno molecular (Rocco A. y cols., 2014; Gerber P. A. y cols., 2016; Marasco M. R. y cols., 2018; Rachdaoui N. y Sarkar D. K., 2017; Catanzaro R. y cols., 2016). El daño causado en páncreas se ve alterado por la no liberación de insulina adecuadamente, el daño causado por la dieta y consumo de etanol conllevaron a que la toxicidad e inflamación por lo que se refleja en una concentración de NO elevada en los grupos administrados con etanol, lo que nos indica que a pesar de desarrollar SM y lo que implica este síndrome sobre la resistencia a insulina el daño causado es por igual al ingerir etanol. Reflejado en el grupo DHC S.S.I se ve afectada ligeramente sobre el grupo control lo que indica que el SM desarrolla alteraciones en las células β pero funcionales, sin embargo, en los grupos administrados con etanol muestra una alta toxicidad de NO por lo cual indica que el estrés oxidativo afecta en mayor proporción a las células β .

7 CONCLUSIÓN

El alcoholismo es un factor considerable para provocar un aumento en el peso corporal asociada a una DHC generando daños de comportamiento. La actividad en ratas con una DHC en CA la ansiedad aumentó y en SC la depresión fue notable al tiempo que mostró su inmovilidad de las ratas en el consumo de etanol. Los grupos control en CA y SC arrojo que guardan una actividad sin cambios considerables en sus conductas bajo el consumo de etanol. EL consumo de dietas altas en calorías y consumo constante de etanol es precursor a tener un estrés oxidativo alto provocando así una muerte celular y tener daños en diferentes regiones del cerebro, bajando así toda la actividad motora y de supervivencia. Así mismo, el estrés oxidativo generador de ROS y NOS provoca daños en diferentes órganos, desarrollando así un déficit en el comportamiento general y provocando una mala calidad de vida. Actualmente México vive en un ambiente desfavorable ya que la alimentación está sujeta a su mayoría a dietas de alto índice calórico, alcoholismo, estrés social, ambiental son las principales, esto causara un impacto depresivo y ansioso, generando así problemas de salud y aumentando los índices morbilidad en todo el país.

8 ESPECTATIVAS

- Los esfuerzos futuros de investigación deben dirigirse a evaluar las funciones específicas de los diferentes tipos de bebidas alcohólicas.
- Investigación en la disminución de NO en corazón en condiciones de estrés.
- Se necesitan más estudios para especificar los mecanismos por los cuales el alcohol crónico afecta la función de las células β .
- La patogénesis de la NAFPD todavía se desconoce, y no hay teorías satisfactorias.
- Llevar un control durante el desarrollo de SM junto con antioxidante para verificar que tan potenciales son al SM.

9 BIBLIOGRAFIA

1. Adem Can, David T. Dao, Chantelle E. Terrillion, Sean C. Piantadosi, Shambhu Bhat, Todd D. Gould, January 2012, Department of Psychiatry, University of Maryland School of Medicine, Tulane University School of Medicine, The Tail Suspension Test.
2. A. Diaz, C. Escobedo, S. Treviño, R. Chávez, G. Lopez-Lopez, C. Moran, J Guevara, B. Venegas and G Muñoz-Arenas. Hindawi, Volume 2018, Metabolic Syndrome Exacerbates the Recognition Memory Impairment and Oxidative-Inflammatory Response in Rats with an Intrahippocampal Injection of Amyloid Beta 1–42.
3. Alain Bessis, Catherine Béchade, Delphine Bernard, and Anne Roumier, Noviembre 2006, Biologie Cellulaire de la Synapse, Inserm U789, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm 75005 Paris, France, Microglial Control of Neuronal Death and Synaptic Properties.
4. Chan Hum Park, Kyeong Hun Park, Seung Gil Hong, Jae Su Lee, Jeong Hyun Baek, Gong In Lee, Jeong Wook Heo & Takako Yokozawa, Agosto 2018, Oligonol, a low-molecular-weight polyphenol derived from lychee peel, attenuates diabetes induced pancreatic damage by inhibiting inflammatory responses via oxidative stress-dependent mitogen-activated protein kinase/nuclear factor- κ B signaling.
5. Diego Redolar Ripoll, Cerebro y Adicción, 2008, Ed. UOC pag.229.
6. DONGJU SEO AND RAJITA SINHA, 2014, The neurobiology of alcohol craving and relapse.
7. Dongsheng Cai and Tiewen Liu, February 2012, Vol. 4, No 2, Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF- κ B.
8. Edith V. Sullivan. Adolf Pfefferbaum, Abril 2005, Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair.
9. Eduardo Vadillo, Rosana Pelayo, Mayo 2012, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Los receptores tipo Toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyético.
10. Helmut Kettenmann, Frank Kirchhoff, and Alexei Verkhratsky, January 2013 Max-Delbrück Center for Molecular Medicine, 13125 Berlin, Germany Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper.
11. Helmut Sies, Carsten Berndt, and Dean P. Jones, abril 2017, Oxidative Stress.

12. Hideaki KANETO, Junichi FUJII, Theingi MYINT, Nobuko MIYAZAWA, Kazi N. ISLAM, Yoshimi KAWASAKI, Keiichiro SUZUKI, Masahiro NAKAMURA, Haruyuki TATSUMI, Yoshimitsu YAMASAKI and Naoyuki TANIGUCHI, Agosto 1996, Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreaticb-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction.
13. Hui Peng, Chelsea R.G. Nickell, Kevin Y. Chen, Justin A. McClain, & Kimberly Nixon, February 2017, University of Kentucky Department of Pharmaceutical Sciences Increased expression of M1 and M2 phenotypic markers in isolated microglia after four-day binge alcohol exposure in male rats.
14. INEGI Tabulados básicos 2018.
15. Jie Liu, Liang Zhou, Keming Xiong, Grzegorz Godlewski, Bani Mukhopadhyay, Joseph Tam, Shi Yin, Peter Gao, Xin Shan, James Pickel, Ramon Bataller, James O'hare, Thomas Scherer, Christoph Buettner, y George Kunos, Enero 2012, Laboratory of Physiologic Studies, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, and Laboratory of Genetics, National Institute on Mental Health, Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice.
16. Jorge M. Barcia, Miguel Flores-Bellver, Maria Muriach, Javier Sancho-Pelluz, Daniel Lopez-Malo, Alba C. Urdaneta, Natalia Martinez-Gil, Sandra Atienzar-Aroca, and Francisco J. Romero, 2015, Matching Diabetes and Alcoholism: Oxidative Stress, Inflammation, and Neurogenesis Are Commonly Involved.
17. Melisa Etchegoyen, Mariana H. Nobile, Francisco Baez, Barbara Posorski, Julian González, Néstor Lago, José Milei and Matilde Otero-Losada, April 2018, Frontiers in neuroscience, Metabolic syndrome and neuroprotection.
18. O. Pechánová, Z V Varga, M Cebová, Z Giricz, P Pacher and P Ferdinandy, British Journal of Pharmacology September 2014, Cardiac NO signaling in the metabolic syndrome.
19. Olivier Pascuala, Sarrah Ben Achoura, Philippe Rostaing, Antoine Triller and Alain Bessis, Noviembre 2011, Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, F-75005 Paris, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1024, F-75005 Paris, France; and Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8197, F-75005 Paris, France, Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory.
20. Orna Ernst, Tsaffrir Zor, December 2010, Department of Biochemistry, Tel Aviv University, Linearization of the Bradford Protein Assay.
21. Promega Corporation, 2009, Griess Reagent System, INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCT G2930.

22. Pushpjeet Kanwar, Kris V. Kowdley, 2015, The Metabolic Syndrome and Its Influence on Nonalcoholic Steatohepatitis.
23. Sara Fernandez-Lizarbe, Maria Pascual and Consuelo Guerri, agosto 2009, Critical Role of TLR4 Response in the Activation of Microglia Induced by Ethanol.
24. Secretaria de salud – Epidemiologia 2017.
25. Sigma Aldrich, Bradford Reagent, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
26. T. Jordan Walter & Fulton T. Crews, Abril 2017, Microglial depletion alters the brain neuroimmune response to acute binge ethanol withdrawal.
27. Tienush Rassaf, Peter Ferdinandy and Rainer Schulz, 2013 Nitrite in organ protection.
28. Tomoyuki Murano, Hisatsugu Koshimizu, Hideo Hagihara & Tsuyoshi Miyakawa, marzo 2017, Transcriptomic immaturity of the hippocampus and prefrontal cortex in patients with alcoholism.
29. Uwe-Karsten Hanisch & Helmut Kettenmann, October 2007, Institute of Neuropathology, University of Göttingen, Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain
30. Ben Givens, Joe M. Williams, & T. Michael Gill, Octubre 1999, Department of Psychology, Ohio State University, Columbus, Ohio, Septohippocampal Pathway as a Site for the Memory-Impairing Effects of Ethanol.
31. Binu Ramachandran, Saheeb Ahmed, Noman Zafar, & Camin Dean, Agosto 2014, Trans-Synaptic Signaling Group, European Neuroscience Institute (ENI), Ethanol Inhibits Long-Term Potentiation in Hippocampal CA1 Neurons, Irrespective of Lamina and Stimulus Strength, Through Neurosteroidogenesis
32. L. L. Dugan, S. L. Sensi, L. M. T. Canzoniero, S. D. Handran, S. M. Rothman, T. S. Lin, M. P. Goldberg, & D. W. Choi, Octubre 1995, Center for the Study of Nervous System Injury and Department of Neurology, Washington University Medical School, Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate.
33. Jann Hau and Gerald L. Van Hoosier, Jr, 2003, Animal models, 2nd ed, ED CRC PRESS Handbook of laboratory Animal Science, P.P
34. Andrea Mora Gallegos, Sofía Salas Castillo, septiembre 2014, Centro de Investigación en Neurociencias, Universidad de Costa Rica, Modelos animales de miedo y ansiedad: descripciones neuro-conductuales.
35. John F. Cryan, Cedric Mombereau, Annick Vassout, 2005, Psychiatry Program, Neuroscience Research, The Novartis Institutes for Biomedical Research WSJ, The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice.

36. Helena M. Abelaira, Gislaine Z. Réus, João Quevedo, 2013, Laboratory of Clinical Neurosciences, National Science and Technology Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Center of Excellence in Applied Neurosciences of Santa Catarina (NENASC), Animal models as tools to study the pathophysiology of depression.
37. Josiane C. Cruz, Atalia F. L. Flôr, Maria S. França Silva, Camille M. Balarini, and Valdir A. Braga, 2015, Reactive Oxygen Species in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus Alter Sympathetic Activity During Metabolic Syndrome.
38. Samuel Treviño, Rubén A Vázquez Roque, Gustavo, López-López, Claudia Pérez Cruz, Carolina Moran, Anhabella Handal Silva, Enrique González Vergara, Gonzalo, Flores, Jorge Guevara, Alfonso Díaz, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Pue., México. Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Pue., México, CINVESTAV, Metabolic syndrome causes recognition memory impairments and reduced the hippocampal neuronal plasticity in rats.
39. Gregory Traversy & Jean Philippe, Chaput Healthy Active Living and Obesity Research Group, Children's Hospital of Eastern Ontario Research Institute, 401 Smyth Road, Ottawa, ON K1H 8L1, Canada, January 2015, Alcohol Consumption and Obesity: An Update
40. Carmen Sayon Orea, Miguel A Martinez Gonzalez, and Maira Bes Rastrollo, 2011, Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Navarra, Navarra, Spain, Alcohol consumption and body weight: a systematic review.
41. Alice Carrier, Dec 2016, Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, Institut Paoli Calmettes, CRCM, Marseille, France, Metabolic syndrome and oxidative stress: a complex relationship
42. Luciana Hannibal, January 2016, Department of Pathobiology, Lerner Research Institute, USA; Lehrstuhl für Bioanorganische Chemie, Department Chemie und Pharmazie, Universität Erlangen-Nürnberg. Germany; Departamento de Bioquímica and Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, Nitric Oxide Homeostasis in Neurodegenerative Diseases.
43. Sergiu D. Dumitrescu, Andras T. Meszaros, Stefan Puchner, Adelheid Weidinger, Mihaly Boros, Heinz Redl and Andrey V. Kozlov, May 2016, Ludwig Boltzmann Institute for Experimental and Clinical Traumatology, Vienna, Austria. Institute of Surgical Research, University of Szeged, Szeged, Hungary, EPR Analysis of Extra and Intracellular Nitric Oxide in Liver Biopsies
44. Elías Ernesto Aguirre Siancas, Julio 2015, Revista Mexicana de neurociencia, Academia Mexicana de Neurología A.C. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú, La función del hipocampo en el procesamiento de la memoria y su deterioro durante el envejecimiento.

45. Shinji Kawahito, Hiroshi Kitahata, Shuzo Osh, 2009. Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia- induced oxidative stress. World Journal of Gastroenterology,
46. Howard C. Becker, Ph. D., 2012, Effects of alcohol dependence and withdrawal on stress responsiveness and alcohol consumption.
47. Sukhpreet Singh, Natalia A Osna, Kusum K Kharbanda, September 2017, Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liverdisease: A review, World J Gastroenterol
48. Alba Rocco, Debora Compare, Debora Angrisani, Marco Sanduzzi Zamparelli, Gerardo Nardone, 2014, Alcoholic disease: Liver and beyond, World J Gastroenterol.
49. Ramon Bataller, Bin Gao, 2015, Liver Fibrosis in Alcoholic Liver Disease, Thieme Medical Publishers
50. Richard M. Ransohoff and V. Hugh Perry, 2009, Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses
51. Jennifer M Pocock and Helmut Kettenmann, September 2007, Neurotransmitter receptors on microglia, Elsevier
52. Elena Dossi, Flora Vasile, Nathalie Rouach, 2017, Human astrocytes in the diseased brain, ELSEVIER
53. Jeffrey M. Long, Audrey N. Kalehua, Nancy J. Muth, Michael E. Calhoun, Mathias Jucker, John M. Hengemihle, Donald K. Ingram and Peter R. Mouton, 1998, Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus, ELSEVIER.
54. Nolan, M.F., Malleret, G., Dudman, J.T., Buhl, DL, Santoro, B., Gibbs, E., Vronskaya, S., Buzsáki, G., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R., Morozov, A., 2004. A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons, Cell.
55. Witter, M.P., Griffioen, A.W., Jorritsma Byham, B., Krijnen, J.L., 1988. Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway, ELSEVIER.
56. Tingting Wang, Suxin Luob, Honghua Qina, Yong Xia, January 2018, Hsp90 inhibition renders iNOS aggregation and the clearance of iNOS aggregates by proteasomes requires SPSB2. ELSEVIER.
57. Michal Kielbik, Izabela Szulc-Kielbik and Magdalena Klink, April 2019, The Potential Role of iNOS in Ovarian Cancer Progression and Chemoresistance. MDPI.

58. Ning Xia, Ulrich Förstermann and Huige Li, 2017, Effects of resveratrol on eNOS in the endothelium and the perivascular adipose tissue. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*
59. Weiwei Xia, Jie Yin, Zhang S., Guob C., Lib Y., Zhangb Y., Zhangb A., Jia Z., Chen H., 2018, Parkin Modulates $ERR\alpha$ /eNOS Signaling Pathway in Endothelial Cells. *Karger Open Access.*
60. Jie Peng, Yun Rao, Xue Yang, Ji Jia, Youping Wu, Jianhua La, Yuanxiang Tao, Weifeng Tu, April 2017, Targeting neuronal nitric oxide synthase by a cell penetrating peptide Tat-LK15/siRNA bioconjugate. *ELSEVIER.*
61. Philip K. Moore and Rachel L. C. Handy, 1997, Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase is no NOS really good NOS for the nervous system?. *ELSEVIER.*
62. Yeomans M.R, Caton S, Hetherington M.M. 2003, Alcohol and food intake. *Lippincott Williams & Wilkins.*
63. Kathryn D. Baker, Amy Loughman, Sarah J. Spencer, Amy C. Reichelt, 2017, The impact of obesity and hypercaloric diet consumption on anxiety and emotional behavior across the lifespan. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.*
64. P. Zanini, B.D. Arbo, G. Niches, D. Czarnabay, F. Benetti, M.F. Ribeiro, A.L. Cecconello, 2017, Diet induced obesity alters memory consolidation in female rats. *Physiology & Behavior*
65. L. G. Kolik, A. V. Nadorova, V. N. Stolyaruk, I. A. Miroshkina, I. B. Tsorin, and S. A. Kryzhanovskii, November, 2016, Anxiolytic Properties of Trimetazidine in Experimental Models of Increased Anxiety. *Springer Science.*
66. Sergio Di Meo, Tanea T. Reed, Paola Venditti and Victor Manuel Victor, May 2016, Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions, *Hindawi Publishing Corporation.*
67. Leon G. Coleman Jr, Jian Zou, Liya Qin, Fulton T. Crews, October 2017, HMGB1/IL-1b complexes regulate neuroimmune responses in alcoholism. *ELSEVIER*
68. Anna Gadek Michalska, Joanna Tadeusz, Paulina Rachwalska, Jan Bugajski, 2013, Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacological Reports.*
69. Clare J. Wilhelm¹, Joel G. Hashimoto, Melissa L. Roberts, Shelley H. Bloom, Melissa R. Andrew, Kristine M. Wiren, 2015, Astrocyte Dysfunction Induced by Alcohol in Females but Not Males. *Brain Pathology.*
70. Liliana Brambilla, Francesca Martorana and Daniela Rossi, 2013, Astrocyte signaling and neurodegeneration: new insights into CNS disorders. *Prion*
71. M. A. Prendergast, B. R. Harris, P. J. Mullholland, J. A. Blanchard II, D. A. Gibson, b R. C. Holley and J. M. Littleton, 2004, Hippocampal CA1 region neurodegeneration produced by ethanol withdrawal requires activation of intrinsic polysynaptic hippocampal pathways and function of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*

72. Josiane C. Cruz, Benedito H. Machado, 2008, GABA and nitric oxide in the PVN are involved in arterial pressure control but not in the chemoreflex responses in rats. ELSEVIER
73. F. D. McBryde, B. H. Liu, E. V. Roloff, S. Kasparov, J. F. R. Paton, 2017, Hypothalamic paraventricular nucleus neuronal nitric oxide synthase activity is a major determinant of renal sympathetic discharge in conscious Wistar rats. WILEY Experimental Physiology
74. Pál Pacher, Joseph S. Beckman and Lucas Liaudet, 2007, Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. Physiological Society.
75. Pál Pacher, Richard Schulz, Lucas Liaudet and Csaba Szabó, 2005, Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. ELSEVIER.
76. Catherine Brenner, Lorenzo Galluzzi, Oliver Kepp, Guido Kroemer, 2013, Decoding cell death signals in liver inflammation. Journal of Hepatology
77. Mohammad Hosein Farzaei, Mahdi Zobeiri, Fatemeh Parvizi, Fardous F. El-Senduny, Ilias Marmouzi, Ericsson Coy-Barrera, Rozita Naseri, Seyed Mohammad Nabavi, Roja Rahimi and Mohammad Abdollahi, 2018, Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. Nutrients
78. Ouahiba Sihali-Beloui, Djamila Aroune, Fella Benazouz, Adile Hadji, Salima El-Aoufi, Sergio Marco, 2019, A hypercaloric diet induces hepatic oxidative stress, infiltration of lymphocytes, and mitochondrial reshuffle in Psammomys obesus, a murine model of insulin resistance. ELSIVIER
79. Maddalena Frau, Francesco Feo, Rosa M. Pascale, 2013, Pleiotropic effects of methionine adenosyltransferases deregulation as determinants of liver cancer progression and prognosis. Journal of Hepatology
80. Tung-Ming Leung, Man-Lung Fung, Emily C. Liang, Thomas Y.H. Lau, Amin A. Nanji and George L. Tipoe, 2011, Role of nitric oxide in the regulation of fibrogenic factors in experimental liver fibrosis in mice. Histology and Histopathology
81. Philipp A. Gerber, Guy A. Rutter, 2016, The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta cell dysfunction in diabetes mellitus. Antioxidants & Redox Signaling
82. Michelle R. Marasco, Abass M. Conteh, Christopher A. Reissaus, John E. Cupit V, Evan M. Appleman, Raghavendra G. Mirmira, Amelia K. Linnemann, 2018, Interleukin-6 Reduces β -cell Oxidative Stress by Linking Autophagy with the Antioxidant Response. The American Diabetes Association
83. Nadia Rachdaoui and Dipak K. Sarkar, Vol. 38, 2017, Pathophysiology of the Effects of Alcohol Abuse on the Endocrine System.
84. Roberto Catanzaro, Biagio Cuffari, Angelo Italia, Francesco Marotta, 2016, Exploring the metabolic syndrome: Nonalcoholic fatty pancreas disease. World Journal Gastroenterol
85. Fulton T. Crews, Colleen J. Lawrimore, T. Jordan Walter, Leon G. Coleman Jr, 2017 The role of neuroimmune signaling in alcoholism. Neuropharmacology, ELSEVIER