Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación

Facultad de Artes y Educación Física

Departamento de Kinesiología

**“EFECTO DEL CONSUMO DE ALCOHOL TIPO ATRACÓN (BINGE DRINKING) SOBRE EL METABOLISMO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN RATAS (*RATTUS NORVEGICUS*)”**

Tesis para optar al grado de Licenciado en Kinesiología

Autores: Gonzalez Jimenez Alfonso Ignacio; Sepúlveda Andrade Sebastian Alfonso

 Profesor Guía: Dr. César Osorio Fuentealba

 Santiago de Chile, Abril 2018

Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación

Facultad de Artes y Educación Física

Departamento de Kinesiología

**“EFECTO DEL CONSUMO DE ALCOHOL TIPO ATRACÓN (BINGE DRINKING) SOBRE EL METABOLISMO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN RATAS (*RATTUS NORVEGICUS*)”**

Tesis para optar al grado de Licenciado en Kinesiología

Autores: González Jiménez Alfonso Ignacio; Sepúlveda Andrade Sebastian Alfonso

 Profesor Guía: Dr. César Osorio Fuentealba

 Santiago de Chile, Abril 2018

Autorizado para

Sibumce Digital

# Autorización

2018, Alfonso González; Sebastián Sepúlveda

Se autoriza la reproducción total o parcial de este material, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, siempre que se haga la referencia bibliográfica que acredite el presente trabajo y sus autores.

# Agradecimientos

Queremos agradecer la instancia que se nos ha presentado durante estos últimos 2 años de trabajar en este proyecto, agradecer a nuestro Profesor guía Dr. César Osorio Fuentealba por el apoyo y disponibilidad constante. Agradecer al equipo del Laboratorio de Fisiología del Músculo de la Universidad de Chile, en especial a el Dr. Enrique Jaimovich por darnos la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Junto con esto, agradecer especialmente también a Gonzalo Jorquera Olave, por ser un gran guía en este gran proceso de tesis.

Se nos hace imperativo agradecer de manera especial a nuestros padres, hermanos y amigos que han estado con nosotros desde el principio y han sido pieza fundamental para sacar esta tesis adelante.

**Tabla de contenidos**

[Autorización 4](#_Toc532384449)

[Agradecimientos 5](#_Toc532384450)

[Resumen 8](#_Toc532384451)

[ABSTRACT 10](#_Toc532384452)

[Introducción 12](#_Toc532384453)

[Problema De Investigación 15](#_Toc532384454)

[Objetivos De La Investigación 16](#_Toc532384455)

[Objetivo General 16](#_Toc532384456)

[Objetivos Específicos de la Investigación 16](#_Toc532384457)

[Marco Teórico 17](#_Toc532384458)

[Alcohol Etílico o etanol 17](#_Toc532384459)

[Patrones de Consumo 18](#_Toc532384460)

[Situación global y Alcoholismo 19](#_Toc532384461)

[Alcohol en América 20](#_Toc532384462)

[Episodios de consumo excesivo (ECE) de alcohol a nivel americano 22](#_Toc532384463)

[Consumo de alcohol en Chile. 23](#_Toc532384464)

[Alteraciones metabólicas producidas por el alcohol 25](#_Toc532384465)

[Impacto del alcohol sobre control glicémico 25](#_Toc532384466)

[Alteración de metabolismo basal de glucosa hepática 26](#_Toc532384467)

[Secreción de insulina y alcohol 26](#_Toc532384468)

[Alcohol y consumo de glucosa en músculo esquelético 27](#_Toc532384469)

[Resistencia a la insulina muscular esquelética 27](#_Toc532384470)

[Efectos del consumo crónico de alcohol sobre el músculo esquelético 28](#_Toc532384471)

[Dinámica Mitocondrial 29](#_Toc532384472)

[Fusión Mitocondrial 30](#_Toc532384473)

[Mfn1 30](#_Toc532384474)

[Opa1 31](#_Toc532384475)

[Fisión Mitocondrial 32](#_Toc532384476)

[Fis 1 33](#_Toc532384477)

[Alcohol y la Dinámica Mitocondrial 33](#_Toc532384478)

[MATERIALES Y MÉTODOS 35](#_Toc532384479)

[Tipo de Estudio. El presente estudio, es de diseño experimental prospectivo. 35](#_Toc532384480)

[Animales 35](#_Toc532384481)

[Tratamiento 35](#_Toc532384482)

[Procedimiento de eutanasia 36](#_Toc532384483)

[Determinación de parámetros morfométricos 37](#_Toc532384484)

[Extracción y cuantificación de RNA total 37](#_Toc532384485)

[Análisis de q-PCR en tiempo real 38](#_Toc532384486)

[Prueba de Tolerancia a la Glucosa 40](#_Toc532384487)

[Cuantificación del Tejido Adiposo 40](#_Toc532384488)

[Expresión de resultados y análisis estadístico. 41](#_Toc532384489)

[RESULTADOS 42](#_Toc532384490)

[El alcohol tipo atracón produce un menor desarrollo en ratas 42](#_Toc532384491)

[El alcohol tipo atracón produce un aumento del tejido adiposo intraabdominal 43](#_Toc532384492)

[El alcohol tipo atracón produce un aumento de la glucosa medida en sangre mediante la Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO) 43](#_Toc532384493)

[El alcohol tipo atracón aumenta los niveles de expresión del gen de Fis1 en músculo 45](#_Toc532384494)

[El alcohol tipo atracón aumenta los niveles de expresión del gen Opa1 en el músculo de ratas 47](#_Toc532384495)

[El alcohol tipo atracón aumenta los niveles de expresión del gen Mnf1 en músculo de rata 49](#_Toc532384496)

[DISCUSIÓN 52](#_Toc532384497)

[CONCLUSIONES 56](#_Toc532384498)

[ANEXOS 57](#_Toc532384499)

[Metabolismo del Alcohol 57](#_Toc532384500)

[Referencias bibliográficas 59](#_Toc532384501)

# Resumen

La intoxicación aguda por alcohol o Binge Drinking (BD) es una de las principales preocupaciones sociales y de salud que se asocia a significativos costos tanto sociales como personales. El BD eleva las tasas de mortalidad y morbilidad en la población mundial y Chile no es la excepción, BD ocurre especialmente entre adolescentes y adultos jóvenes, e involucra el consumo igual o superior a 5 bebidas alcohólicas para hombres y de 4 o más bebidas alcohólicas para mujeres. La evidencia actual muestra que el consumo principalmente crónico de alcohol causa miopatías que pueden conducir a la pérdida de masa muscular, desequilibrio en la síntesis de proteínas, alteraciones en las vías de señalización y alteraciones metabólicas. El músculo esquelético es pieza importante en la mantención de la glicemia normal y la mitocondria es el organelo clave en la regulación metabólica y energética de la célula. En otros tejidos, el alcohol produce estrés oxidativo y alteraciones de la dinámica mitocondrial. Sin embargo, los efectos del Binge Drinking a nivel muscular no son completamente comprendidos. En base a estos antecedentes nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Cuáles son las alteraciones que se producen en el músculo esquelético al ser expuesto a un protocolo de BD y de qué manera esto altera la regulación del metabolismo energético? Para abordar esta pregunta se utilizaron crías machos de rata Sprague-Dawley del día postnatal 25 (PND25), las cuales fueron expuestas a etanol (3,0 g/kg, 25% p/v mezcladas en solución salina isotónica) o solución salina (ratas control) en una inyección intraperitoneal (i.p.). Comenzando en PND25 y PND26 con las dosis de etanol y salino, posteriormente se esperó dos días, para luego repetir el procedimiento señalado previamente. Este tratamiento se realizó durante dos semanas en los días PND 25, 26, 29, 30, 33, 34, 37 y 38. El volumen inyectado i.p. dependió del peso de cada animal. De acuerdo con estas variaciones en el tiempo, el volumen total administrado fue de 1-3 ml. Terminado el tratamiento de exposición a BD, los animales fueron sacrificados por decapitación a la una, cuatro y ocho semanas posteriores a la intervención con alcohol o salino. Los patrones de expresión de los genes implicados en la dinámica mitocondrial se analizaron utilizando la técnica qPCR. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. El consumo excesivo de alcohol altera los resultados de la Prueba de Tolerancia de Glucosa Oral (PTGO) y la expresión de los genes Fis1, Mnf1 y Opa1 en los músculos *Gastrocnemius y Soleus*. Por otro lado en *Tibialis* se observó un aumento de Opa1 y una tendencia al aumento en la expresión de los genes Fis1 y Mnf1. Por otra parte, el peso corporal de los animales del grupo alcohol fue menor en comparación al grupo control, durante el periodo de administración del protocolo de alcohol tipo atracón. Los PTGO realizados post tratamiento de alcohol mostraron un aumento en la curva de glucosa en las ratas sometidas al protocolo de alcohol, comparando pre y post protocolo. En cuanto a la cuantificación del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal en las ratas, se observó aumento en el grupo de ratas sometidas a alcohol.

Nuestros resultados sugieren que el consumo excesivo de alcohol en las primeras etapas del desarrollo puede alterar el metabolismo energético relacionado con la glucosa y aumento del tejido adiposo; a nivel mitocondrial en el músculo esquelético se produce un aumento en la expresión de los genes Fis1, Mfn1 y Opa1, todos implicados en la fisión y fusión mitocondrial lo que podría reflejarse en la regulación de la arquitectura mitocondrial, la conectividad entre ellas y la producción de energía.

#

# ABSTRACT

Introduction: Acute alcohol intoxication or Binge Drinking (BD) is one of the main social and health concerns associated with significant social and personal costs. BD raises mortality and morbidity rates in the world population and Chile is not the exception, BD occurs especially among adolescents and young adults, and involves the consumption of ≥5 alcoholic beverages for men and ≥4 alcoholic beverages for women. Current evidence shows that alcohol consumption causes myopathies that can lead to the loss of muscle mass, imbalance in protein synthesis, alterations in signaling pathways and metabolic alterations. Skeletal muscle is an important piece in the maintenance of normal glycemia and mitochondria are a key organelle in metabolic and energetic regulation. In other tissues, alcohol produces oxidative stress and alterations in mitochondrial dynamics. However, the effects of Binge Drinking at the muscle level are not fully understood. Based on this background we consider the following question: What are the alterations that happen in skeletal muscle to be exposed to a protocol of BD and how this alters the regulation of energy metabolism?

Methods: Male Sprague-Dawley rat pups 25 postnatal day (PND25) were used, which were subjected to doses of ethanol (3.0 g / kg, 25% w / v mixed in isotonic saline) or saline (control rats) in an intraperitoneal (ip) injection. Starting at PND25 and PND26 with the doses of ethanol, we proceeded to rest for two days, and then repeat this cycle for two weeks (PND 25, 26, 29, 30, 33, 34, 37 and 38). The volume injected i.p. each animal depended on the weight of each one. According to these variations in time, the amounts administered were 1-3 ml. The expression patterns of the genes involved in mitochondrial dynamics were analyzed using the qPCR technique. The experimental procedures were approved by the Bioethics and Biosafety Committee of the Faculty of Biological Sciences of the Pontificia Universidad Católica de Chile.

Results: Excessive alcohol consumption alters the results of the Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and the expression of the Fis-1, Mfn-1 and Opa-1 genes in the Gastrocnemius and Soleus muscles. On the other hand, Tibialis showed an increase in OPA1 and a tendency to increase the expression of the FIS1 and MFN1 genes. On the other hand, the body weight of the animals was decreased in the alcohol vs control group, during the administration period of the binge-eating alcohol protocol. The OGTTs performed after alcohol treatment showed an increase in the glucose curve in the rats submitted to the alcohol protocol, comparing pre and post protocol. As regards the quantification of epididymal and retroperitoneal adipose tissue in rats, an increase is observed in the rats of the alcohol group.

**Discussion:** Our results suggest that excessive consumption of alcohol in the early stages of development can alter the energy metabolism related to glucose and fats; **at the mitochondrial level in skeletal muscle there is an increase in the expression of genes Fis-1, Mfn-1 and Opa-1**, all involved in mitochondrial fusion and fission, which could be reflected in the regulation of mitochondrial architecture, connectivity between them and the production of energy.

#

# Introducción

El consumo de alcohol se ha transformado en unos de los principales factores de riesgo para la salud pública durante los últimos años, incrementando las tasas de mortalidad y morbilidad en la población (OMS 2017). Se estima que anualmente se producen 3.3 millones de muertes en el mundo por esta razón, lo que representa el 5.9% de todas las defunciones (OMS 2017). Los diferentes trastornos por uso de alcohol (AUDs; Alcohol Use Disordes) son causal de más de 200 enfermedades o trastornos, en donde su severidad estará determinada por factores como edad, tiempo de consumo, tipo de consumo, aspectos nutricionales, estado de órganos y sistemas, entre otros. (OMS, 2014)

Los jóvenes, representan al grupo etario que consume un mayor volumen de alcohol (cantidad de alcohol ingerida por día de consumo), siendo un dato importante a la hora de investigar y plantear posibles soluciones que demuestren los efectos nocivos para la salud debido al consumo de esta sustancia.

A nivel nacional en la última encuesta realizada por Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol de (SENDA) la prevalencia mes de consumo de alcohol asciende a un 48,9% de la población (ENPG, 2014). En base a este dato se estima que 4.801.318 personas entre 12 y 64 años consumieron alcohol el último mes en nuestro país. Cuando se evalúa el consumo intenso o “Binge Drinking” (5 o más tragos en hombres y 4 o más en mujeres en 1,6 días promedio a la semana) se concluye que 2.097.615 personas declaran haber tenido a lo menos un episodio de embriaguez en el último mes, lo que corresponde a un 43.6% de la población consumidora (ENPG, 2014).

Las alteraciones que produce el consumo de alcohol son diversas y el impacto puede no sólo afectar a las personas a un nivel social y/o personal, sino también a nivel celular. A nivel músculo esquelético el consumo de alcohol produce alteraciones en la síntesis proteica e importantes cambios en la eliminación de la glucosa; por lo cual las reducciones cuantitativas en el volumen del músculo apendicular podrían afectar adversamente la eliminación de la glucosa y su metabolismo. (Abdullah et. al, 2015)

Por lo anteriormente expuesto es de suma importancia identificar cuáles son los efectos que genera el patrón de consumo Binge Drinking en el organismo, pues el gran grueso de la información circulante son sólo investigaciones en consumo de alcohol tipo crónico. Por lo tanto, distinguir los efectos propios del consumo tipo BD se hace imperativo para realizar mejores estrategias sanitarias, mejorar la atención que realizar el personal de salud a sus usuarios y mejorar la calidad de vida de las personas en general.

#

# Problema De Investigación

Los problemas con el alcohol comienzan a temprana edad. En población escolar, el 16,6% de los alumnos de 8vo básico ha consumido alcohol el último mes, mientras que en los alumnos de 4º medio esta cifra se triplica con un 51,4% (ENPE, 2013). La edad de inicio de consumo de alcohol en nuestro país se sitúa en promedio a los 13 años (ENPE, 2013). Esta edad de inicio se acerca a la de los estándares regionales (OPS, 2015). Al indagar en el consumo intenso de alcohol, el 63% de los estudiantes de 8vo básico a 4to medio declaran haber tenido a lo menos un episodio en el último mes, lo que representa que casi 2 de cada 3 escolares reportaron consumo intensivo (Binge Drinking) en el último mes (ENPE, 2013). Los jóvenes representan el grupo etario que consume alcohol con mayor frecuencia y en mayor cantidad (OPS 2015).

Nuestra investigación pretende conocer los posibles efectos patológicos que el consumo de alcohol tipo “atracón” provocan en el músculo esquelético. Según antecedentes bibliográficos el consumo agudo y crónico causa diversas miopatías que pueden provocar atrofia, pérdida de masa muscular, desbalance en la síntesis de proteínas, alteraciones en las vías de señalización intracelular muscular, entre otras. (Steiner & Lang, 2015).

El músculo esquelético es un tejido que interactúa con múltiples sistemas en la regulación de la homeostasis del organismo, presenta características físico-mecánicas que requieren una regulación metabólica y enzimática muy precisa, así como de la disponibilidad de sustratos que se encuentran en la circulación sanguínea y que puede ser utilizados (Steiner, & Lang, 2015).

A pesar de la relevancia y los efectos negativos del consumo de alcohol a nivel mundial, se desconocen los efectos que produce el consumo tipo “atracón” a nivel muscular, por lo que nuestro trabajo pretende conocer los efectos sobre la dinámica mitocondrial y los posibles efectos a nivel del metabolismo de glucosa en músculo y así contribuir a establecer las bases para futuras investigaciones.

# Objetivos De La Investigación

##  Objetivo General

Conocer los cambios propios del patrón de consumo de alcohol tipo “Atracón” en los músculos *Gastrocnemius,* *Soleus* y *Tibialis* de la especie *Rattus Norvegicus* y sus posibles consecuencias metabólicas y en la dinámica mitocondrial.

## Objetivos Específicos de la Investigación

* Establecer posibles cambios morfométricos asociados al consumo de alcohol tipo atracón en ratas.
* Describir los posibles efectos en el metabolismo de la glucosa en ratas sometidas a un patrón de consumo de alcohol tipo atracón.
* Determinar los cambios en los patrones de expresión génica de proteínas reguladoras de la dinámica mitocondrial, a través de qPCR en músculos de ratas sometidas a consumo de alcohol tipo atracón.

# Marco Teórico

## Alcohol Etílico o etanol

El alcohol es una sustancia tóxica en términos de sus efectos directos e indirectos sobre una amplia variedad de órganos y sistemas orgánicos. Algunos de los impactos sanitarios adversos del alcohol pueden ser producto de la intoxicación aguda o del ***“binge drinking”*** (consumo de más de 5 tragos en una sola ocasión) aun en una persona que no tiene un problema anterior o persistente de consumo de alcohol. El envenenamiento por alcohol, la pancreatitis aguda y las arritmias cardiacas agudas representan peligros de ese tipo. El consumo crónico de alcohol a largo plazo produce cáncer de boca, esófago (garganta), laringe y faringe. La cirrosis hepática también se asocia estrechamente con el consumo de alcohol, y las investigaciones indican que el efecto tóxico directo del alcohol es la causa principal de esta afección (Lieber 1988). Otras afecciones que pueden asociarse con el daño a tejidos mediado por el alcohol son deterioro de los músculos de las extremidades (Urbano-Márquez y Fernández-Sola 1996).

El etanol es una de las drogas psicoactivas más consumidas, causantes de dependencia y se ha utilizado ampliamente en muchas culturas durante siglos. Pequeñas dosis de etanol, en general, producen euforia y relajación. Las personas que experimentan estos síntomas tienden a ser habladoras y menos inhibidas, y pueden mostrar un mal juicio (Hets, 1988). A dosis más altas, el etanol actúa como un depresor del sistema nervioso central, produciendo con dosis progresivamente más altas, deterioro de la función sensorial y motora, disminución de la cognición, estupefacción, inconsciencia y posible muerte. (Cuervo Orozco, 2017)

La cantidad de etanol en el cuerpo se cuantifica típicamente por el contenido de alcohol en sangre, en unidades peso de etanol por unidad de volumen de sangre (gr/mL).

El alcohol etílico se obtiene de dos maneras:

**1.** Por fermentación de frutas, vegetales (como la levadura o caña de azúcar) o granos. Ej.: vinos, cervezas.

**2.** Por destilación: medio artificial para aumentar la concentración del alcohol de una bebida. Ej.: coñac, ginebra, whisky y vodka.

La fórmula química del alcohol etílico es C2H5OH y su fórmula extendida es CH3CH2OH. También se escribe como EtOH y el nombre IUPAC es etanol. La molécula está formada por una cadena de dos carbonos (etanol), en la que un hidrógeno ha sido sustituido por un grupo hidroxilo (-OH).

## Patrones de Consumo

En base a estos estándares, la OMS ha definido que el límite de consumo de alcohol considerado como consumo de bajo riesgo, es de hasta 20 grs. de alcohol al día, consumo que no debe repetirse por más de 5 días a la semana –recomendando al menos 2 días sin consumo (OMS, 2014).

**El consumo de riesgo** es un patrón de consumo de alcohol que aumenta el riesgo de consecuencias adversas para la salud si el hábito del consumo persiste. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo describe como el consumo regular de 20 a 40 grs. diarios de alcohol en mujeres y de 40 a 60 grs. diarios en varones.

**El consumo perjudicial** se refiere a aquel que conlleva consecuencias tanto para la salud física como para la salud mental de la persona y está definido por la OMS como consumo regular promedio de más de 40 grs. de alcohol al día en mujeres y de más de 60 grs. al día en hombres.

**El consumo excesivo episódico o circunstancial (también llamado binge drinking)**, que puede resultar particularmente dañino para ciertos problemas de salud, implica el consumo, por parte de un adulto, de por lo menos 60 grs. de alcohol en una sola ocasión.

**La dependencia del alcohol** es un conjunto de fenómenos conductuales, cognitivos y fisiológicos en los cuales el uso del alcohol se transforma en prioritario para el individuo, en contraposición con otras actividades y obligaciones que en algún momento tuvieron mayor valor para él (OPS, 2007). (SENDA-MINSAL, 2016)

## Situación global y Alcoholismo

El consumo dañino de alcohol crea una gran carga social y económica para las sociedades (OMS, 2017). El alcohol afecta tanto a las personas y como a las sociedades en general, tanto sanitaria como económicamente. Sus efectos están determinados por el volumen de alcohol consumido y sus hábitos de consumo y en raras ocasiones por la calidad del alcohol que es consumido.

En 2012, podía atribuirse al consumo alcohol, según estimaciones, un 5,9% (3,3 millones) de todas las defunciones a nivel mundial y la pérdida 5,1 años de vida ajustados en función de la discapacidad (AVAD) (OMS, 2015), Más de la mitad de esas muertes fueron resultado de Enfermedades no transmisibles (ENT) (OMS, 2014). El nivel de consumo de alcohol a escala mundial en 2010 se estimaba en 6,2 litros de alcohol puro por persona de 15 años o más (equivalente a 13,5 gramos de alcohol puro por día). Pero menos de la mitad de la población (38,3%) bebe alcohol, lo cual implica que aquellos que lo beben, en promedio consumen 17 litros de alcohol puro por año (OMS, 2014). El informe también señala que un mayor porcentaje de hombres que mujeres mueren por causas relacionadas con el alcohol - 7,6 % de los hombres y 4% de las mujeres -, aunque hay evidencia de que las mujeres pueden ser más vulnerables a los efectos nocivos del alcohol en comparación con los hombres, por lo que existe preocupación por el aumento constante en el consumo de alcohol entre las mujeres. (OMS, 2014)

El consumo de alcohol es un factor causal en más de 200 enfermedades y trastornos (Manthou et al., 2016). Está relacionado con el riesgo de desarrollar problemas de salud tales como trastornos mentales y comportamentales, incluido el alcoholismo, importantes enfermedades no transmisibles que van desde cirrosis hepática, algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares, así como también gran cantidad de traumatismos derivados de la violencia y los accidentes de tránsito (OMS,2010)

Una proporción importante de la carga de morbilidad y mortalidad atribuibles al uso nocivo del alcohol corresponde a los traumatismos, sean o no intencionados, en particular los resultantes de accidentes de tránsito, actos de violencia y suicidios (OMS, 2010). Además, los traumatismos con consecuencia de muerte son atribuibles al consumo de alcohol en las personas relativamente más jóvenes (OMS, 2010)

Recientemente se han establecido relaciones causales entre el consumo nocivo y la incidencia de enfermedades infecciosas tales como la tuberculosis y el VIH/sida (OMS, 2010). El consumo de alcohol por parte de una embarazada puede provocar síndrome alcohólico fetal y complicaciones prenatales. (OPS, 2008)

Según la OMS (2014) la región de las Américas tiene el segundo consumo más alto per cápita de alcohol entre las regiones de la OMS, después de Europa. También tiene la segunda tasa más alta de consumo episódico de alcohol (después de Europa), un patrón de consumo asociado con efectos nocivos para la salud. Además, la región tiene el menor índice de abstención de por vida de consumo de alcohol (OMS, 2014).

## Alcohol en América

En promedio, las personas en el continente americano consumen 8,4 litros de alcohol puro per cápita cada año, lo que coloca a la región en segundo lugar después de Europa, donde las personas consumen 10,9 litros por año y el 22% de los bebedores en las Américas tiene consumos episódicos fuertes de alcohol (por ejemplo, consumiendo seis bebidas estándar en una sola ocasión, una vez por mes o más) (OPS, 2015). En promedio, en el mundo un 16% de los bebedores consumen alcohol de esta manera (OPS, 2015).

La región de las Américas tienen la proporción más baja (18,9%) de abstemios de por vida, o de personas que nunca han consumido alcohol (OPS, 2015), en contraste con lo que vemos a nivel global, donde podemos encontrar que el 48% de las personas son abstemios de por vida (OPS, 2015).

En las Américas, la cerveza es la bebida alcohólica más popular, en tanto contribuye al 55,3% del total del alcohol consumido (OMS,2015). El vino representa un noveno del total del consumo del alcohol en las Américas, debido mayormente a su alto consumo en Argentina y Chile.

Los países con las tasas más altas de consumo de alcohol per cápita y anuales en las Américas son: Granada (12,5 litros), Santa Lucía (10,4 lts.), Canadá (10,2 lts.), Chile (9,6 lts.), Argentina (9,3 lts.), y Estados Unidos (9,2 lts.). Los países de las Américas con el consumo per cápita más bajo son: El Salvador (3,2 litros por año), Guatemala (3,8 lts), Honduras (4 lts.), Jamaica (4,9 lts.), Nicaragua (5 lts.) y Cuba (5,2 lst.) (OMS,2014).

Un estudio reciente de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), oficina regional de la OMS para las Américas, El Salvador, Guatemala y Nicaragua, seguidos por Brasil, México y Cuba, tienen las tasas más altas de mortalidad por causas atribuibles al alcohol, lo cual refleja los patrones nocivos de consumo (OPS, 2015). Las Américas y Europa tienen las proporciones más altas de adolescentes (15 a 19 años) que beben alcohol, con el 53% y el 70% respectivamente, que admiten ser consumidores actualmente (OPS, 2015).

En lo que se refiere a mortalidad el informe asegura que de las defunciones del 2012, el consumo de alcohol ocasionó aproximadamente una muerte cada 100 segundos en la región de las Américas y contribuyó a más de 300.000 defunciones ese año; de ellas, más de 80.000 no habrían ocurrido si no hubiese intermediado el consumo de alcohol (OPS, 2015). Como se señaló anteriormente el consumo de alcohol contribuye al desarrollo de 200 enfermedades y lesiones, incluidas las neoplasias, la infección por el VIH/SIDA y diversos trastornos mentales (OPS, 2015). El alcohol tuvo que ver con 274.000.000 de años de vida sana perdidos (AVAD) en las Américas en el 2012 (OPS, 2015). Se estima que 5,7% de la población de la región declaró sufrir algún trastorno debido al consumo de alcohol, aunque el número probablemente sea mayor (OPS, 2015)

Aunque las preferencias por distintas bebidas alcohólicas dependen a la subregión, también influyen los factores ambientales e históricos que favorecen la producción y el consumo de ciertas bebidas a diferencia de otras (OPS, 2015). En los países del Caribe se prefieren los destilados, mientras que el vino es más popular en Argentina, Chile y Uruguay (OPS, 2015). En algunos países, como Haití, predomina solo un tipo de alcohol (en este caso, los destilados constituyen casi el 100% del alcohol que declaran consumir los haitianos), mientras que en el Perú la cerveza y los licores se consumen más o menos a partes iguales (OPS, 2015)

En los grupos socioeconómicos menos favorecidos el alcohol tiende a mostrar mayores efectos y problemas de salud que en los grupos sociales más acomodados (OPS, 2015). Esta situación la podemos encontrar en la región de las Américas como en el resto del mundo (OPS, 2015). A la hora de analizar el género, se observa una tendencia a equiparar los volúmenes de consumo entre hombres y mujeres (OPS, 2015). En específico, las Américas es la región del mundo donde las mujeres presentan la prevalencia más alta de trastornos relacionados con el consumo de alcohol (OPS, 2015). El grupo de mayor volumen de consumo de alcohol son los jóvenes (OPS, 2015). En las Américas, la mayoría de los estudiantes encuestados tomaron la primera copa antes de los 14 años de edad. En el 2010, las muertes atribuidas al alcohol en menores de 19 años fueron alrededor de 14.000 (OPS, 2015).

## Episodios de consumo excesivo (ECE) de alcohol a nivel americano

Los ECEs son consideramos una forma de medir el peligro del consumo del alcohol, junto con ser una herramienta muy útil para cuantificar los riesgos para la salud (OPS,2015). Algunos datos indican que el consumo regular de cantidades pequeñas de alcohol reporta beneficios limitados para la salud, pero la mayoría de las personas no consumen alcohol en esas cantidades (OMS, 2015). Los ECE se utilizan para indicar que el patrón de consumo perjudicial que se está desarrollando esta anulando por completo el posible efecto positivo de beber en cantidades pequeñas, y a su vez aumentan enormemente el riesgo de enfermedad y de otros efectos perjudiciales (OPS,2015). En América la prevalencia es muy alta: uno de cada cinco consumidores actuales (22%) protagoniza un ECE por lo menos una vez al mes, por encima del promedio mundial del 16% (OMS, 2014). Tanto el Paraguay como Saint Kitts y Nevis tienen prevalencias de ECE superiores al 50%. Chile, por otro lado, tiene la prevalencia más baja, a pesar de que el consumo de alcohol per cápita (APC) es relativamente alto, lo cual quizá sea un reflejo de la cultura de acompañar con vino las comidas en lugar de las borracheras en los bares o en las fiestas (aunque las tendencias entre los jóvenes de nuestro país se aprecian cambios en dicha costumbre (OPS,2015).Además se observan grandes diferencias entre los hombres y las mujeres, así como entre los distintos grupos de edad, en lo que concierne a la prevalencia de ECE. Al igual que el consumo total, los hombres son mucho más propensos que las mujeres a los ECE (OPS,2015) . Los países con la prevalencia más alta del ECE tanto entre los hombres como entre las mujeres son el Paraguay, Saint Kitts y Nevis y Dominica, por orden descendente. Por el contrario, en Chile, mientras las mujeres casi no afirman haber tenido ningún ECE (cerca del 0,1%), entre los hombres chilenos es mucho más alta la prevalencia de ECE (OPS,2015)

## Consumo de alcohol en Chile.

En la última encuesta realizada por el SENDA la prevalencia mes de consumo de alcohol asciende a un 48,9% de la población chilena (ENPG, 2014). En base a este dato se estima que 4.801.318 personas entre 12 y 64 años consumieron alcohol el último mes en nuestro país (SENDA, 2016)

En población escolar, el 16,6% de los alumnos de 8vo básico ha consumido alcohol el último mes, mientras que en los alumnos de 4º medio esta cifra se triplica con un 51,4% (SENDA, 2013). La edad de inicio de consumo de alcohol en nuestro país se sitúa en promedio a los 13 años (SENDA, 2013). Esta edad de inicio es cercana al promedio regional (OPS, 2015). Al estudiar el consumo intenso de alcohol, el 63% de los estudiantes de 8vo básico a 4to medio declaran haber tenido a lo menos un episodio en el último mes, lo que representa que casi 2 de cada 3 escolares reportaron consumo intensivo en el último mes (SENDA, 2013). En relación al género, se ha visto un aumento considerable en las prevalencias de consumo de alcohol en mujeres desde el primer estudio en población general hasta ahora. La tendencia muestra un aumento de consumo en las mujeres en relación a los hombres, llegando a prevalencias cada vez menos distantes (SENDA , 2013) Es así que en 1994, el 50,6% de hombres y el 31,0% de mujeres declararon consumo último mes a diferencia del año 2014 donde el 55,3% de hombres y el 42,5 % de mujeres reportaron beber alcohol en el último mes (ENPG, 2014).

El alcohol es la droga más consumida por los chilenos y las cantidades son considerablemente mayores en comparación con países de la región (OMS, 2014). No obstante, la cantidad de alcohol no es el único elemento que caracteriza la magnitud de los problemas relacionados con el consumo de alcohol.

A nivel internacional existen diversas formas de definir el consumo de alcohol y sus niveles de riesgo. En primer lugar y para establecer un acuerdo que facilite la estimación de la cantidad de alcohol consumido por los individuos, se ha convenido medir el contenido de etanol o alcohol puro de cada bebida. Esta ecuación se efectúa calculando la proporción entre el grado alcohólico de una bebida (destilada o fermentada), la cantidad de mililitros y luego se realiza la conversión a gramos. Es así como se ha definido el UBE o unidad de bebida estándar, la que equivale a 1 trago de alcohol lo que implica algunas diferencias entre los países. Por ello, no existe un acuerdo entre los distintos gramos de alcohol puro que cada trago contiene. Por su parte, la OMS sostiene una definición de unidad de bebida estándar (UBE) o medida estándar de alcohol, en 10 gramos de alcohol puro por trago (OPS, 2007). En el caso de UK el UBE se define en 8 gramos o 10 ml de alcohol puro (SENDA-MINSAL, 2016). EN lo que respecta a la cuantificación estándar de alcohol, en Chile la ENS 2010 informa que el gramaje promedio de alcohol por trago, de acuerdo a las costumbres de consumo en el país equivale a 15,5 grs. por trago (Margozzini, 2014), es decir, el trago estándar casi duplicaría el límite recomendado observado en Reino Unido, así como también sería mayor al límite establecido por OMS. Por su parte, la guía de intervención breve define el estándar de 14 grs. para realizar las estimaciones de consumo en el país (MINSAL, 2011).

Para realizar un análisis completo del fenómeno se considera necesario describir y agregar otros indicadores asociados a los patrones y características de consumo de la población. Por ello, es necesario abordar los patrones de consumo y en ello diferenciar los potenciales efectos negativos de cada uno. Al contrastar a Chile con los países de la región éste se sitúa en el primer lugar en cantidad de consumo de alcohol per cápita al año, con un total de 9,6 litros de alcohol puro per cápita en adultos (OMS, 2014). Esta cifra, que hace referencia al volumen de etanol presente en todos los tipos de alcohol consumidos en el país, representa un volumen de 1.099.000 de litros anuales, cifra que alcanza los 61,3 litros por persona. En relación a los periodos de tiempo en los que acontece el consumo de alcohol en nuestra población, se estima que el volumen de alcohol ya mencionado se consume en sólo 1,6 días promedio a la semana, es decir, el consumo de alcohol se focaliza en cortos periodos de tiempo. A modo comparativo, en países de alto consumo, como Francia, la mitad de la población consume todos o casi todos los días de la semana, y un porcentaje muy bajo de la población (menos del 5%) consume en grandes cantidades, sobre 60 grs. (MINSAL, 2010).

Como bien sabemos el patrón de consumo en nuestro país estaría asociado a episodios de atracón, focalizados en un día o dos a la semana, patrón ya descrito como “Binge Drinking”, a modo de ejemplo, en el rango etario de 18-29 años se presentan patrones de consumo mucho más problemáticos, llegando a un promedio de 80 grs. de alcohol puro el día de consumo (MINSAL, 2010).

En promedio los hombres consumen entre 7 y 9 tragos por día y las mujeres, entre 3 y 5 tragos (MINSAL, 2010). Ambos exceden la recomendación de la OMS. Este patrón de consumo estaría presente en el 25% de la población consumidora (MINSAL, 2010). Otro dato importante es que a través de análisis de resultados de acuerdo a Test de Identificación de Trastornos Debido al Consumo de Alcohol (AUDIT C) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre las mediciones 2009-10 y 2016-17 (IC 95)% sobre consumo de riesgo (11,7%), lo que se refiere a la mantención del número de consumidores riesgosos de alcohol datados entre los años 2009 y el 2017.

## Alteraciones metabólicas producidas por el alcohol

### Impacto del alcohol sobre control glicémico

La homeostasis de la glucosa es primordial para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central, sistema muscular y las células que necesitan obligatoriamente de este sustrato metabólico . Las alteraciones agudas y crónicas en la concentración de glucosa pueden impactar negativamente sobre la función celular y de los órganos (Avogaro & Tiengo, 1993).

Estudios en humanos y una variedad de modelos preclínicos indican que la administración aguda de alcohol puede producir una reducción o ningún cambio en la concentración circulante de glucosa (Ki-Jarvinen et al. 1988; Siler. 1998). Esta dicotomía en su gran mayoría puede explicarse por el estado nutricional del huésped en el momento en que se administra el alcohol, por ejemplo, la duración del ayuno o la falta de éste, la cantidad de alcohol administrado y el nivel resultante de alcohol en la sangre (BAL). Por esto, la hipoglicemia se produciría en humanos con trastorno por consumo de alcohol (AUD) qué también tienen un estado nutricional ya deficiente o una función hepática gravemente dañada (Williams, 1984). Un metanálisis publicado respalda los estudios de que en humanos no hubo ningún efecto del consumo de alcohol (10-70 kg/día) sobre la concentración de glucosa en individuos no diabéticos (Schrieks et al, 2015), lo que corroboró los hallazgos de varios grandes estudios prospectivos, de corte transversal de población (Schrieks et al, 2015).

### Alteración de metabolismo basal de glucosa hepática

La determinación *in vivo* del constante movimiento de glucosa transhepática en perros en ayunas de 48-72 h, esencialmente sin reservas de glucógeno, indica que el alcohol agudo altera notablemente la gluconeogénesis (Lochner, Wulff & Madison, 1967) La gluconeogénesis estimulada por lactato, también se encuentra inhibida de manera dosis dependiente cuando es administrada de forma aguda en el hígado perfundido *in situ* y cuando se agrega a hepatocitos aislados (Baranyai & Blum 1989). Si bien esta capacidad del alcohol para antagonizar la utilización efectiva del lactato explica parcialmente la hiperlactacidemia observada después de una administración de alcohol aguda en sujetos que se encontraban en ayunas tanto a corto como a largo el alcohol también aumenta la producción neta de lactato del músculo esquelético (Crouse, 1968; Kreisber 1971, Dittmar, 1978)

### Secreción de insulina y alcohol

El fuerte consenso de los modelos *in vitro* y *ex vivo*, aunque no del todo coherente, sugiere que el alcohol inhibe la secreción de insulina (Steiner, Lang, 2015). En páncreas perfundidos aislados, el alcohol no alteró la secreción basal de insulina pero sí la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) de una manera que el efecto era dependiente de la dosis (Tiengo et al., 1981).

## Alcohol y consumo de glucosa en músculo esquelético

El músculo en relación al peso corporal representa el 40% a 45% de éste, siendo un tejido metabólicamente activo. Molina et al. (1991) utilizó *in vivo* 2-desoxiglucosa marcada con 14C (2DG) para rastrear la captación regional de glucosa en ratas durante 4 h de administración continua de alcohol, lo cual no alteró las concentraciones basales de glucosa o insulina (Molina et al, 1991). En respuesta al consumo agudo de alcohol, el músculo gastrocnemio redujo su absorción de glucosa, mientras que en el cuádriceps blanco y rojo no se observaron cambios y tampoco en los músculos abdominales y diafragma (Molina et al., 1991). Otro estudio también reportó una baja en la captación de glucosa en algunos músculos (p. Ej., Cuádriceps rojo y Sóleo), pero no así en otros, gastrocnemio y cuádriceps blanco. (Spolarics et al., 1994)

Por último, cabe destacar que bajo influjo de alcohol se ha observado una disminución en la fosforilación del receptor de insulina, sustrato receptor de insulina (IRS-1) y Akt en condiciones basales no estimuladas con insulina en algunos estudios (Nguyen et al 2012)

## Resistencia a la insulina muscular esquelética

El músculo esquelético representa el depósito corporal más grande responsable de IMGU (consumo de glucosa inducido por insulina) (DeFronzo, et al., 1981; Lang et al., 1990) Por lo tanto, una disminución aguda inducida por el alcohol en IMGU por el músculo esquelético *per se* se deduce de experimentos en los que la captación de glucosa estimulada por insulina de todo el cuerpo disminuye durante la fijación de glucosa (Spolarics,1994; Lang, 2014).. La interpretación de estos hallazgos aparentemente consistentes es complicada por un informe que muestra que la magnitud de la resistencia a la insulina inducida por el alcohol depende de la cepa de las distintas ratas (Lang, 2014).

La glucosa incorporada por el músculo se puede oxidar a través de la glucólisis o almacenarse como glucógeno (por ejemplo, metabolismo no oxidativo). El alcohol agudo reduce el consumo de glucosa no oxidativa estimulada por la insulina en el glucógeno, según se evalúa mediante la incorporación de 14C-glucosa, en una amplia variedad de músculos de contracción rápida y lenta de ratas (Xu, D; 1996) sin embargo, en otros estudios, este defecto sólo se observó en los músculos de contracción rápida (Cook, 1992), que es el sitio primario de la miopatía inducida por el alcohol (Lang, 2005).

Finalmente, en humanos, el alcohol redujo de forma aguda la captación y el almacenamiento de glucosa por el músculo durante una pinza (clamp) hiperinsulinémica euglucémica (Steiner, Crowell, Lang, 2015) aunque esta alteración en la deposición de glucógeno no se asoció con una actividad reducida de la glucógeno sintasa (Boden, 1993). A pesar de la observación consistente de que el alcohol agudo y crónico afecta la IMGU determinada in vivo por el músculo, hay poco consenso sobre el mecanismo que subyace a la resistencia a la insulina. En teoría, el alcohol puede atenuar la acción de la insulina en una serie de pasos regulatorios reconocidos, como la vía de transducción de señales PI3K/Akt y/o translocación GLUT4. (Wasserman, 2009)

## Efectos del consumo crónico de alcohol sobre el músculo esquelético

Mientras que el consumo de alcohol ligero a moderado tiene un efecto **protector** en algunos sistemas orgánicos (por ejemplo, cardiovascular), tanto el consumo excesivo de alcohol crónico y la intoxicación aguda afecta adversamente el sistema de órganos múltiples y aumenta la mortalidad en última instancia. (Steiner, Lang, 2015).

Las primeras investigaciones en ratas mostraron que el consumo crónico de alcohol redujo el contenido de proteínas musculares y la síntesis de proteínas preferentemente en las miofibras de tipo II, alterando varios componentes de la maquinaria sintética de proteínas y sus vías de transducción de señales (Hanid et al., 1981; Preedy, 1991).

El desequilibrio prolongado en la homeostasis proteica resultante del consumo excesivo de alcohol crónico se manifiesta como una disminución en la masa muscular y el área transversal (CSA) del músculo rico en fibras tipo II y el desarrollo de miopatía proximal (Steiner, Lang, 2015) El desequilibrio prolongado entre la síntesis y la degradación de proteínas del músculo esquelético representa el mecanismo básico de la miopatía inducida por alcohol. Sin embargo, la tasa reducida de síntesis de proteínas musculares *per se* parece ser el principal contribuyente a esta condición catabólica (Steiner, Lang, 2015)

Además de su acción miopática, el etanol puede tener otros efectos sobre el metabolismo muscular. En voluntarios humanos, el etanol puede inhibir agudamente la captación de glucosa de los músculos de las extremidades inferiores durante el ejercicio, reduce los efectos estimulantes del ejercicio prolongado en la captación de glucosa por los músculos de la pierna ejercitadas y causa resistencia aguda a la insulina periférica, como también una disminución de la oxidación de la glucosa (Shelmet, 1988). El etanol también disminuye la utilización de glucosa en perros en ayuno (Lochner, Wulff & Madison, 1967) y altera la captación de glucosa de diafragma aislados de rata (Clarke, 1960).

La miopatía del músculo esquelético es una consecuencia conocida de la ingesta prolongada de altos niveles de alcohol y puede ocurrir independientemente de la enfermedad hepática y otras comorbilidades asociadas (Preedy et al., 2003). La pérdida muscular proviene de un desequilibrio en donde la degradación proteica supera a la síntesis, si bien la intoxicación aguda por alcohol puede producir rabdomiolisis, no produce pérdida de masa muscular *per se*, debido a su corta duración (Haller y Knochel, 1984). Sin embargo, en administración aguda de alcohol se observan cambios moleculares similares a los de la ingesta crónica. (Steiner y Lang, 2015). Además, el consumo excesivo de alcohol parece aumentar la pérdida de masa muscular cuando se mantiene a lo largo del tiempo (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2012).

## Dinámica Mitocondrial

Diferentes estudios demuestran que la dinámica mitocondrial juega un importante papel en la función de las mitocondrias, regulando distintos procesos fisiológicos como la fosforilación oxidativa, su movimiento a lo largo del citoesqueleto, la regulación de la arquitectura mitocondrial, el ciclo celular, la apoptosis y también su conectividad entre mitocondrias, mediada por eventos de fusión y fisión (Zorzano, 2012) El grupo de Skulachev fue el primero en proponer un papel funcional a las redes mitocondriales observadas en células musculares (Zorzano, 2012). En estudios anteriores a la identificación de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial, Skulachev y colaboradores demostraron que los filamentos mitocondriales presentaban continuidad de la matriz y que esto era importante para el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial (Amchenkova, 1988; Skulachev, 2001). Sobre la base de estas observaciones, Skulachev propuso la hipótesis de que los filamentos mitocondriales podrían actuar como cables transmisores de energía. Así, en células como las fibras musculares, estos filamentos mitocondriales permitirían la transmisión del potencial de membrana mitocondrial desde las mitocondrias localizadas en la periferia de la célula a las mitocondrias internas, con menor disponibilidad de oxígeno (Skulachev, 2001). En los últimos años, se ha demostrado que alteraciones en la actividad de las proteínas de dinámica mitocondrial afectan al metabolismo energético. Estos antecedentes relevan la importancia que tiene la dinámica mitocondrial en la fisiología celular, tras la identificación de los genes responsables de la fusión y de la fisión mitocondriales. Además, la alteración en la actividad de proteínas de fusión o fisión mitocondrial modula el metabolismo muscular (Detmer, Chang, 2007)

## Fusión Mitocondrial

Las mitocondrias se organizan en redes tubulares o ramificadas y se encuentran en equilibrio dinámico gracias a la actividad de los procesos de fusión y de fisión mitocondriales (Nunnari, 1997; Yaffe, 1999) La fusión mitocondrial es esencial para facilitar la intercomplementación del ADN mitocondrial y también como parte de una respuesta al estrés celular (Chen, 2005). Para asegurar el mantenimiento de compartimentalización mitocondrial, tanto la membrana mitocondrial interna como la externa necesitan fusionarse. Las principales proteínas implicadas en la fusión mitocondrial son las GTPasas de la membrana mitocondrial externa: Mitofusinas (Mfn1 y Mfn2) y la GTPasa de atrofia óptica (Opa1) de la membrana mitocondrial interna (Zorzano, 2012). Mitofusinas 1 y 2 son proteínas ancladas en la membrana mitocondrial externa y se ha demostrado que regulan la arquitectura de la red mitocondrial mediante la inmovilización y la fusión de las mitocondrias vecinas (Chen et al, 2003; Santel, 2001). Aunque los genes Mfn1 y Mfn2 presentan una expresión relativamente ubicua, los dos genes muestran diferentes niveles de expresión de ARNm en diferentes tejidos. Así, se detectan tránscritos de Mfn1, en niveles similares, en una variedad de tejidos humanos y son muy abundantes en el corazón; en cambio, los niveles de ARNm para Mfn2 son muy abundantes en el corazón y el tejido muscular, y se encuentran en niveles más bajos en muchos otros tejidos (Zorzano, 2012).

### Mfn1

La Mfn1, una proteína con actividad GTPasa, se encuentra en la membrana mitocondrial externa y muestra dos dominios transmembrana localizados hacia el extremo C-terminal de la proteína, cerca de un dominio héptada repetitiva (HR2) (Santel, 2003). Este dominio héptada repetitiva media el primer paso de la fusión mitocondrial, el cual consiste en la interacción e inmovilización de dos mitocondrias adyacentes a través de la formación de un dímero antiparalelo entre dos moléculas de Mfn1. Estos complejos diméricos pueden ser de tipo homotípicos (Mfn1-Mfn1 o Mfn2 Mfn2) o heterotípicos (Mfn1-Mfn2) (Koshiba, 2004; Detmer, 2007). Cabe destacar que la tasa de fusión mitocondrial depende de los dímeros homo- o heterotípicos; Mfn1 muestra una mayor actividad GTPasa en comparación con Mfn2. En este sentido, las mitocondrias que expresan Mfn1 muestran una eficiencia mayor de interacción e inmovilización de mitocondrias, que aquellas que expresan Mfn2 (Shihara, 2004)

### Opa1

En las levaduras la proteína Mgm1 de la familia de las dinaminas fue identificada inicialmente como un actor implicado en el mantenimiento de la red mitocondrial, hecho acorde con su localización en el espacio entre la membrana y su asociación con la membrana mitocondrial interna. La proteína de Mgm1 en mamíferos es Opa1, y es también esencial para la fusión mitocondrial (Chen & Chan, 2005). Opa1 se localiza en la membrana mitocondrial interna y en el espacio intermembrana. Opa1 ha sido estudiada en microscopía electrónica y fue detectada en las crestas (Chen & Chan, 2005; Cipolat, 2004.), y una pequeña fracción de Opa1 constituída por las denominadas isoformas cortas, se asocia a la membrana mitocondrial externa (Satoh, 2003)

Se sabe de la existencia de distintas isoformas de Opa1. Estas isoformas están además reguladas a su vez por la actividad de proteasas mitocondriales que reconocen a Opa1 en sitios de corte específicos en respuesta a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la pérdida de ADN mitocondrial o a la inducción de apoptosis (Ishihara, 2006; Griparic, 2007). Se han identificado una gran variedad de proteasas que pueden procesar Opa-1 en diferentes puntos de la molécula, y que regulan el equilibrio entre las isoformas largas y cortas de Opa1. Esto puede estar vinculado a dos fenómenos que no necesariamente ocurren de manera excluyente: a un cambio de Opa1 modifica el potencial de membrana mitocondrial, el cual a su vez es requerido para el proceso de fusión (Legros, 2002; Olichon, 2003), y a Opa1 que se ha mostrado su interaccion con Mfn1 (Cipolat, 2004.) y con Mfn2 (Guillery, 2008).

Se ha descrito que la actividad de profusión de Opa1 es esencial en el proceso de control de calidad de las mitocondrias. Esto ocurre a través del proceso llamado de “Kiss and-run”, fenómeno que consiste en la fusión transitoria entre mitocondrias (Liu, 2009). Las mitocondrias que muestran una actividad deficiente de Opa1 (una capacidad de fusión reducida) y bajo potencial de membrana mitocondrial, tendrán obviamente una reducida capacidad de “kiss-and-run” y por lo tanto, serán degradadas por autofagia (Twig, 2008). Por otra parte, un exceso de actividad de fusión por parte de Opa-1 puede puede generar un papel protector frente a algunos tipos de estrés celulares (Tondera, 2009), dando inicio al fenómeno conocido como senescencia para proteger a la célula de la alta producción de especies reactivas de oxígeno y con esto evitar la generación de daño en el genoma mitocondrial (Lee, 2007). Alteraciones en la expresión de Opa1, afectan también al óptimo metabolismo mitocondrial. Por lo mismo, la represión de Opa1 en células MEF (fibroblastos embrionarios de ratón) mediante ARNi (ARN de interferencia) provoca una reducción en el potencial de membrana mitocondrial, una marcada disminución de la respiración basal y una incapacidad para incrementar el consumo de oxígeno en presencia del desacoplante 2,4-dinitrofenol (Chen, 2005). Los primeros datos que se refieren a las consecuencias de mutaciones de OPA1 sobre el metabolismo energético, demuestran que el músculo de pacientes con atrofia óptica autosómica dominante (ADOA) presenta una baja en la producción de ATP (Lodi, 2004).

## Fisión Mitocondrial

El proceso de fisión mitocondrial es necesario para destruir las mitocondrias viejas o dañadas de la célula a través de un proceso de autofagia llamado mitofagia (Kim, 2007). La velocidad de fisión aumenta considerablemente cuando las células se comprometen en el proceso de apoptosis, y esto sucede sin un aumento compensatorio en la tasa de fusión (Suen, 2008). Los cambios que se pueden producir en la maquinaria de fisión causan una mayor generación de especies reactivas de oxígeno, y con esto aumenta la susceptibilidad de las células a inducir apoptosis, a una capacidad diferente para generar ATP, y una población heterogénea de mitocondrias con una distribución no uniforme del ADNmt (Parone, 2008). La importancia fisiológica de la fisión mitocondrial se manifestó tras la identificación inicial de la proteína Drp1 (miembro de la familia de las dinaminas) y Fis1.

### Fis 1

El reclutamiento de la proteína de levadura Dnm1 desde el citosol a la membrana mitocondrial externa, es realizado a la asociación con la proteína Fis-1, lo que resulta en la formación de un complejo de fisión y en la división de las membranas mitocondriales (Zorzano, 2012). Esta interacción se produce con la participación de la proteína adaptadora Mdv1, que tiene un papel en el co-ensamblaje de Dnm1 en estructuras helicoidales.

En mamíferos, Fis1 es una pequeña proteína de 17,2 kDa que se expresa ubicuamente y se detecta en toda la red mitocondrial. Fis-1 está anclada en la membrana mitocondrial externa a través de su extremo C-terminal, que contiene una hélice alfa, un dominio transmembrana, y una cola C-terminal expuesta al espacio intermembrana. La parte N-terminal de la proteína contiene cuatro regiones distintas con cinco hélices alfa (Dohm, 2004; Suzuki, 2003); la primera hélice alfa de Fis-1 parece ser crítica para la oligomerización y su actividad de fisión (Jofuku, 2005). Las siguientes cuatro hélices alfa constituyen dos repeticiones de tipo “tetratrico-peptide” (TPR1 y TPR2), y aunque no son necesarias para la oligomerización de Fis-1, están implicados en las interacciones proteína-proteína necesaria para la fisión (Jofuku, 2005). La sobreexpresión de Fis1 causa fragmentación mitocondrial, mientras que la pérdida de función de Fis1 resulta en la formación de una red mitocondrial altamente fusionada indicando que la fisión se bloquea en condiciones en las que los eventos de fusión se mantienen.

## Alcohol y la Dinámica Mitocondrial

Estudios recientes muestran que la división y fusión contínua de las mitocondrias tiene un impacto directo sobre la morfología, función y distribución de éstas. (Detmer, Chang, 2007) Se ha descrito que los procesos de fusión y fisión mitocondrial controlan la forma, longitud y número de mitocondrias. Además influye en el intercambio de membranas lipídicas y contenido intramitocondrial, lo cual es crucial para el buen funcionamiento de la población general de mitocondrias (Detmer, Chang, 2007). Otra función importante de los procesos de fusión y fisión mitocondrial es la ubicación de las mitocondrias a lugares específicos dentro de la célula que facilitan la apoptosis regulando la liberación de proteínas al citosol. De esta manera la dinámica mitocondrial tiene consecuencias para el desarrollo celular normal, el progreso de alguna enfermedad y la apoptosis (Detmer, Chang, 2007).

El balance y la función de las proteínas musculares dependen mucho de la función mitocondrial normal; Por lo tanto, los déficits en la producción de ATP pueden estar causalmente relacionados con el desarrollo de la miopatía alcohólica (Hoek, Cahill y Pastorino, 2002). Los primeros estudios utilizando microscopía de luz y electrónica demostraron cambios morfológicos difusos en las mitocondrias en sujetos con miopatía alcohólica aguda y crónica, aunque no se cuantificaron y no se evaluó su importancia funcional (Klinkerfuss, et al, 1967; Urbano-Márquez et al., 1989).

También se ha reportado que el tamaño y/o número de mitocondrias puede estar disminuido en humanos con uso crónico de alcohol (Song & Rubin 1972; Urbano-Márquez, Fernández-Sola, 2004; Kiessling et al., 1975).

#

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Tipo de Estudio.El presente estudio, es de diseño experimental prospectivo.

## Animales

Se utilizaron ratas sprague dowley machos de 25 días de edad, los animales fueron asignados en 2 grupos de forma aleatoria, y se designaron como Control y tratado, el grupo tratado fue sometido a exposición alcohol vía inyección intraperitoneal y el grupo control fue sometido a inyección salina.

Los animales que presentaron reacciones adversas al alcohol o alteraciones de salud, determinado por el veterinario encargado del bioterio, no fueron incluidos en el estudio y fueron sacrificados por una sobredosis de tiopental.

## Tratamiento

La dosis de etanol utilizada por cada animal fue de 3.0 g/kg de peso, 25% peso/volumen mezcla salina isotónica administrada a través de una inyección intraperitoneal (i.p) Grupo tratado con etanol tipo atracón (BEP), el grupo control fue tratado con un volumen igual de solución salina isotónica Grupo tratamiento salino, SP. Ambos tratamientos de alcohol y salino fueron administradas al comienzo del día 25 de post natal (PND25). Una segunda inyección fue dada el PND26, seguido de dos días sin inyección. Este patrón de inyección fue repetido de tal forma que las ratas recibieron inyección el PND 25, 26, 29, 30, 33, 34, 37 y 38 como se describió previamente Lerma Cabrera et al., 2013. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo cuarenta y ocho horas después de la última (8º) dosis de etanol. (Pascual et al., 2009).



**Figura 1: Protocolo de administración de alcohol tipo atracón**

## Procedimiento de eutanasia

Los animales tratados con alcohol (BEP) y control (SP) fueron sacrificados 1 semana, 4 semanas y 8 semanas posterior al tratamiento, siendo eutanasiados por decapitación, este procedimiento se puede usar para sacrificar roedores y pequeños conejos en entornos de investigación, este método proporciona un medio para recuperar tejidos y fluidos corporales que no están químicamente contaminados ya que se realiza sin anestesia. El manejo y la restricción requeridos para realizar esta técnica pueden ser angustiantes para los animales. La angustia se minimiza en gran medida en animales que se manejan con regularidad y están acostumbrados a ser recogidos por los investigadores (ref). El procedimiento fue realizado por un técnico competente y con experiencia, utilizando una guillotina en buen estado, para ello el animal fue sujeto de forma segura dentro de un tubo plástico transparente e introdujo su cabeza dentro de la guillotina hasta exponer la región cervical dentro de la zona de corte de la misma, y luego fue accionada la guillotina, produciendo la decapitación por un corte único y certero.

## Determinación de parámetros morfométricos

Los animales fueron pesados antes, durante y después de ser sometidos al protocolo de exposición de alcohol tipo atracón y administración de suero salino, a fin de determinar las variaciones de peso corporal durante el tratamiento, adicionalmente una vez sacrificados los animales (por decapitación), se cuantificó la masa grasa epididimal y retroperitoneal como estimador de la acumulación de tejido adiposo. Pruebas de tolerancia a la glucosa de vía oral (PTGO), fueron efectuadas antes de iniciar el tratamiento de alcohol y una, cuatro y ocho semanas posterior al término de la intervención de alcohol.

## Extracción y cuantificación de RNA total

Se extrajo el RNA total utilizando el reactivo Trizol en una muestra de tejido muscular de rata, según los protocolos del fabricante y bajo campana. (Las superficies del área de trabajo fueron limpiadas previamente junto con las pipetas a utilizar). La muestra tratada con 1 mL de Trizol fue lisada con un homogenizador de esferas. Luego se trató la muestra con 0,2 mL de cloroformo, se agitó por 30 segundos y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada a 12.300 rpm, por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa o sobrenadante es recuperada (aproximadamente 450 mL), la cual contiene el RNA. Se agregó 0,5 mL de Isopropanol (2-propanol) y 0,3 µL del reactivo GlycoBlue (Ambion). Se dejó precipitar el RNA durante 24 horas a -20°C.

Las muestras fueron centrifugadas a 12.300 rpm por 15 minutos a 4°C, posterior a esto, se elimina el sobrenadante y el precipitado obtenido es lavado con 1 mL de Etanol al 80%. Se centrifuga nuevamente a 12.300 rpm, por 5 minutos a 4°C. Se elimina el Etanol y se dejó secar el precipitado por 20 minutos. Se re-suspendió el precipitado en 20µL de Agua sin nucleasas.

Para garantizar la integridad del RNA total obtenido, se realizó un tratamiento con un reactivo que elimina restos de DNA que puedan haber sido arrastrados durante el proceso, y que de esta forma, contaminen la muestra.

Se agrego 1,2 µL de 10X Turbo Buffer DNAasa Free y 1 µL de Turbo DNAasa a cada tubo. Se dejó incubar por 25 minutos a 37°C y luego se le adiciona 1,2 µL de DNase Inactivation Reagent a cada tubo. Posterior a esto se centrifugó a 11.200 rpm, por 2 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante (aproximadamente 10µL). Se determinó la concentración de RNA total mediante un espectrofotómetro (BioPhotometer Plus, Eppendorf), y se midió la absorbancia a 260 nm. De esta forma se garantiza la pureza del RNA contenido en la muestra.

A partir de los valores de concentración obtenidos en el espectofotómetro, se calculan los valores necesarios de RNA total y agua sin nucleasas para obtener cDNA a 1µg/mL. Para esto se siguen las instrucciones del fabricante en donde se realiza una solución que contiene 1µL de dNTP y 1µL de PolyDT a cada muestra. (adicionando un tubo mas como control, que no tenga Transcriptasa Reversa). Se lleva a un termociclador (Matercycle Eppendorf) y se aplica el programa según protocolo del fabricante. Después del tiempo programado, se adiciona a las muestras una segunda solución que contiene 3,5µL de agua sin nucleasas, 4µL de Buffer 5X, 0,25 µL de RNAsin, 0,25 µL de SSII y 2µL de DTT 0,1 M a cada muestra (la muestra sin Transcriptasa Reversa no contiene 0,25 µL de SSII, y es reemplazado por agua sin nucleasas). Se introducen nuevamente al termociclador y se comienza la segunda etapa del programa según protocolo del fabricante.

Una vez finalizado, las muestras de cDNA (copia complementaria de DNA) se guardaron a -20°C hasta su uso.

## Análisis de q-PCR en tiempo real

Esta técnica es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN). Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, al menos un par de partidores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador con sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real. En muchos casos el molde que se emplea para el PCR cuantitativa es ADN complementario (ADNc), de hebra simple, obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN); en este caso, la técnica es un RT-PCR cuantitativo o en tiempo real, o RT- qPCR. Mediante esta técnica se evaluaron los niveles de expresión MFN1, OPA y FIS1, a partir de muestras obtenidas de ratas sometidas a consumo de alcohol tipo atracón y controles.

Para la determinación de los cambios en el RNA mensajero de Fis1, Opa1 y Mfn1 se utilizó PCR en tiempo real con el equipo Mx3000P, Stratagene. Junto con esto el kit utilizado fue 5X HOT FIREPol, EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX), de la marca Solis BioDyne. El mix contiene HOT FIREPol DNA Polymerase; 5X EvaGreen qPCR buffer; 12,5 mM MgCl2; dNTPs; EvaGreen dye; ROX dye. Para cada PCR se utilizaron 4 µL 5X HOT FIREPol, EvaGreen qPCR Mix Plus, 0,5 µL Primer Forward, 0,5 µL Primer Reverse, 1 µL DNA templado, 15 µL agua sin nucleasas; todo para cada tubo.

Para la amplificación de los genes se utilizó el siguiente protocolo: 95°C por 1 minuto, luego 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 65°C por 20 segundos, 72°C por 20 segundos.

En cada experimento, los valores de los genes estudiados fueron normalizados a la expresión de B-Actina en conjunto con los otros genes a analizar. Los productos del PCR fueron verificados por el análisis de las curvas de disociación.

Los partidores utilizados fueron:

Fis1:

* AAG TAT GTG CGG GGA CTG T (forward)
* TGC CTA CCA GTC CAT CTT TC (reverse)

Opa1:

* GAT GAC GCG CTC TCC AGT GAA G (forward)
* CTC AGG GCT AAC AGT ACA ACC (reverse)

Mnf1:

* ATT GGG GAG GTG CTG TCT C (forward)
* TTC GGT CAT AAG GTA GGC TTT (reverse)

Todos los oligonucleotidos son para el modelo de rata, Rattus Norvegicus, a partir de las secuencias publicadas en NCBI Gen Bank.

## Prueba de Tolerancia a la Glucosa

MATERIALES

• Tiras reactivas One.Touch (Johnson & Johnson)

• Glucómetro One-Touch (Johnson & Johnson)

• Isofluorano Baxter (algodón en tubo falcon 50ml)

• Jeringa plástica de 10 ml de volumen marca BD

• Bisturí

• Balanza Arquimed

PROCEDIMIENTO

Todos los animales fueron pesados y se les administrò 2 gramos de glucosa por kilogramo de peso. Posteriormente se realizó el despunte de cola del animal y para obtener una gota de sangre y medir la glicemia utilizando un glucómetro marca One-Touch y su tira reactiva. Esta medición fue realizada en el tiempo cero (basal). Luego se inyectó la solución de glucosa a nivel intraperitoneal con el animal anestesiado con isofluorano (cantidad de acuerdo al peso de cada animal) y se repite la medición de la glicemia a los tiempos 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posterior a la inyección de glucosa, presionando ligeramente la cola para obtener una gota de sangre de 200 uL de volumen.

## Cuantificación del Tejido Adiposo

Las muestras de tejido adiposo fueron extraídas quirúrgicamente del animal posteriormente a ser sacrificado. Se realizó una incisión en la zona epididimal y retroperitoneal. Luego se extrajo el tejido adiposo que en esa zona se encuentra, para posteriormente ser masado, tanto para las ratas del grupo control como del grupo alcohol.

## Expresión de resultados y análisis estadístico.

Los datos experimentales son presentados como el promedio ± desviación estándar (DS) de un número de experimentos indicados como (n) o como resultados representativos de al menos 4 experimentos independientes. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y las comparaciones entre los grupos se llevaron a cabo a través de ANOVA *Bonferroni*,

mediante el uso del programa *GraphPad Prism 4.*(*GraphPad Software*, San Diego, CA). Un valor *p*<0.05 se consideró como unadiferencia estadísticamente significativa.

# RESULTADOS

## El alcohol tipo atracón produce un menor desarrollo en ratas

Se midieron los pesos de los animales durante el tiempo en el cual fueron sometidos al protocolo de alcohol tipo atracón o salino. El objetivo fue evaluar los cambios que se pudiesen producir durante este periodo de tiempo, y comparar el aumento de peso entre los grupos control y alcohol. En la Fig. 2 se muestran los cambios en el peso corporal (gr) durante los días de administración del protocolo de alcohol tipo atracón en los grupos control y alcohol. A partir del día 8 desde el inicio del tratamiento se observa una disminución significativa en el peso corporal de las ratas sometidas a tratamiento con alcohol.



**Figura 2**: Disminución del peso (gr) en las ratas sometidas al protocolo de alcohol tipo atracón durante el tiempo de administración, en comparación con el grupo control Este aumento presenta diferencias estadísticamente significativas. Valores representan el promedio +/- SD. \*\*\*P < 0,001, \*\*P < 0,01, \*P < 0,05 vs. grupo control. Datos son obtenidos de 26 animales.

## El alcohol tipo atracón produce un aumento del tejido adiposo intraabdominal

Se cuantificó la acumulacion de tejido adiposo epididimal y retroperitoneal en ratas que fueron sometidas al protocolo de alcohol tipo atracón y control, después de la exposición al tratamiento correspondiente.

El objetivo fue cuantificar las diferencias que podían existir entre los grupos control y alcohol, en relación a la acumulacion de tejido adiposo. En la Fig. 3 se muestran los cambios en la acumulacion de tejido adiposo epididimal y retroperitoneal en ratas sometidas a protocolo de alcohol tipo atracón, en comparación con las ratas del grupo control. Se puede observar que hubo un mayor aumento del tejido adiposo en la zona epididimal que retroperitoneal.



Figura 3: La acumulación de tejido adiposo extraído de las zonas epididimal y retroperitoneal es mayor en el grupo de ratas sometidas a alcohol (BEP) en comparación con las ratas del grupo control

 Este aumento fue estadísticamente significativo. Valores representan el promedio +/- SD. \*\*\*P < 0,001, \*P < 0,05 vs. grupo control. Datos obtenidos de 12 animales.

## El alcohol tipo atracón produce un aumento de la glucosa medida en sangre mediante la Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO)

Se midió la concentración de glucosa en sangre mediante la Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO) en las ratas del grupo alcohol y control. Estas mediciones se llevaron a cabo previo al tratamiento de administración de alcohol y post tratamiento de alcohol.

El objetivo era analizar las diferencias que se pudiesen encontrar en relación a la homeostasis de la glucosa pre y post tratamiento con alcohol.

En la figura 4A se muestran las curvas obtenidas de la medición de PTGO realizadas pre y post protocolo salino en el **grupo control**. La curva de color negro indica los resultados obtenidos pre tratamiento, mientras que la curva azul muestra los resultados obtenidos post tratamiento. Se puede señalar que no se observaron diferencias significativas en el grupo control en las ratas sometidas al protocolo pre y post administración salina. Así mismo, se evidencia una similitud entre ambas curvas tomadas en diferentes periodos de tiempo.

Por otra parte, en la figura 4B se muestran las curvas obtenidas de la medición de PTGO realizadas pre y post protocolo de alcohol en el **grupo BEP**. La curva de color negro muestra los resultados obtenidos pre tratamiento de alcohol, es decir cuando las ratas aún no eran sometidas al protocolo. Mientras la curva de color rojo muestra los resultados obtenidos post tratamiento de administracion de alcohol, en el mismo grupo de ratas. Se puede observar que existen diferencias significativas entre las curvas de PTGO obtenidas pre y post protocolo de alcohol. En este grupo de ratas el efecto del protocolo de alcohol provocó la variación en las mediciones tomadas en diferentes periodos de tiempo. Se observa un mayor peak de glucosa medida en sangre después de 60 minutos de administración, el cual se mantiene hasta los 120 minutos, siendo un cambio significativo en comparación con la curva pre administracion de alcohol.



Figura 4:. La glucosa en sangre medida con PTGO post tratamiento de alcohol en el grupo BEP es mayor en comparación con la medición realizada pre tratamiento de alcohol en el mismo grupo de ratas. Este aumento es significativo después de los 60 minutos de comenzado el test. No se observaron diferencias significativas en el grupo control al comparar las curvas pre y post tratamiento salino. Valores representan el promedio +/- SD. \*\*P < 0,01, \*P < 0,05 vs. grupo control. No se observaron diferencias en el grupo control en las ratas sometidas al protocolo salino pre y post administración. Valores representan el promedio +/- SD. \*\*P < 0,01, \*P < 0,05 vs. grupo control. Datos obtenidos de 12 animales

## El alcohol tipo atracón aumenta los niveles de expresión del gen de Fis1 en músculo

Se cuantificó la expresión del gen Fis1, implicado en la fisión mitocondrial, con el objetivo de evaluar posibles cambios en los niveles de expresión en ratas sometidas a un patrón de consumo de alcohol tipo atracón. Los cambios fueron estudiados en muestras correspondientes a los músculos *Gastronecmius, Tibialis* y *Soleous*. Se realizó un mínimo de 3 experimentos independientes para cada muestra en ratas control y alcohol.

En la figura 5A se muestran los cambios entre el grupo BEP y Control en la expresión del gen Fis1 en el músculo Gastrocnemius. Se observa un aumento significativo en la expresión de este gen en el grupo de ratas que fueron sometidas al protocolo de alcohol cuando son comparadas con el grupo control.

En la figura 5B se muestran los cambios entre el grupo BEP y Control en la expresión del gen Fis1 en el músculo Soleus. Se observa un aumento significativo en la expresión de este gen en el grupo de ratas que fueron sometidas al protocolo de alcohol cuando son comparadas con el grupo control.

Mientras que en la figura 5C se muestran los cambios entre el grupo BEP y Control en la expresión del gen Fis1 en el músculo Tibialis. No se pueden observar cambios entre los grupos de ratas sometidos al protocolo de alcohol y control.



Figura 5A . La expresión del gen Fis-1 en el músculo Gastrocnemius es mayor en el grupo BEP en comparación con el grupo control. Este aumento fue estadísticamente significativo. Valores representan el promedio de +/- SD, \*P < 0,05 vs. grupo control.



Fig. 5B. es mayor en el grupo BEP en comparación con el grupo control. Este aumento fue estadísticamente significativo. Valores representan el promedio de +/- SD, \*P < 0,05 vs. grupo control.



Fig. 5C. La expresión del gen Fis-1 en el músculo *Tibialis,* no presentó diferencias significativas entre los grupos BEP y control. Valores representan el promedio de +/- SD, \*P < 0,05 vs. grupo control.

## El alcohol tipo atracón aumenta los niveles de expresión del gen Opa1 en el músculo de ratas

Se cuantificó la expresión del gen Opa1 implicado en la fusión mitocondrial, con el objetivo de evaluar posibles cambios en los niveles de expresión en ratas sometidas a un patrón de consumo de alcohol tipo atracón. Los cambios fueron estudiados en muestras correspondientes a los músculos *Gastronecmius, Tibialis* y *Soleus*. Se realizó un mínimo de 3 experimentos independientes para cada muestra en ratas control y alcohol.

En la figura 6A se muestran los cambios entre el grupo BEP y Control en la expresión del gen Opa1 en el músculo *Gastronecmius*. Se observa un aumento significativo en la expresión de este gen en el grupo de ratas que fueron sometidas al protocolo de alcohol cuando son comparadas con el grupo control.

En la figura 6B se muestran los cambios entre el grupo BEP y Control en la expresión del gen Opa1 en el músculo *Soleus*. Se observa un aumento significativo en la expresión de este gen en el grupo de ratas que fueron sometidas al protocolo de alcohol cuando son comparadas con el grupo control.

Mientras que en la figura 6C se muestran los cambios entre el grupo BEP y Control la expresión del gen Opa1 en el músculo *Tibialis*. Se observa un aumento significativo en la expresión de este gen en el grupo de ratas que fueron sometidas al protocolo de alcohol cuando son comparadas con el grupo control.



(Fig. 6A) La expresión del gen Opa1 en el músculo *Gastrocnemius* es mayor en el grupo BEP en comparación con el grupo control. Este aumento fue estadísticamente significativo. Valores representan el promedio de +/- SD, \*P < 0,05 vs. grupo control.



(Fig.6C) La expresión del gen Opa1 en el músculo *Tibialis* es mayor en el grupo BEP en comparación con el grupo control. Este aumento fue estadísticamente significativo. Valores representan el promedio de +/- SD, \*P < 0,05 vs. grupo control.



(Fig. 6B) La expresión del gen Opa1 en el músculo *Soleus* es mayor en el grupo BEP en comparación con el grupo control. Este aumento fue estadísticamente significativo. Valores representan el promedio de +/- SD, \*P < 0,05 vs. grupo control.

## El alcohol tipo atracón aumenta los niveles de expresión del gen Mnf1 en músculo de rata

Se cuantificó la expresión del gen Mnf1, implicado en la fusión mitocondrial, con el objetivo de evaluar posibles cambios en los niveles de expresión en ratas sometidas a un patrón de consumo de alcohol tipo atracón. Los cambios fueron estudiados en muestras correspondientes a los músculos *Gastronecmius, Tibialis* y *Soleus*. Se realizó un mínimo de 3 experimentos independientes para cada muestra en ratas control y alcohol.

En la figura 7A se muestran los cambios entre el grupo BEP y Control en la expresión del gen Mnf1 en el músculo *Gastronecmius*. Se observa un aumento significativo en la expresión de este gen en el grupo de ratas que fueron sometidas al protocolo de alcohol cuando son comparadas con el grupo control.

En la figura 7B se muestran los cambios entre el grupo BEP y Control en la expresión del gen Mnf1 en el músculo *Soleus*. Se observa un aumento significativo en la expresión de este gen en el grupo de ratas que fueron sometidas al protocolo de alcohol cuando son comparadas con el grupo control.

Mientras que en la figura 7C se muestran los cambios entre el grupo BEP y Control la expresión del gen Mnf1 en el músculo *Tibialis*. No se pueden observar cambios entre los grupos de ratas sometidos al protocolo de alcohol y control.



(Fig. 7A) La expresión del gen Mnf1 en el músculo *Gastrocnemius* es mayor en el grupo BEP en comparación con el grupo control. Este aumento fue estadísticamente significativo. Valores representan el promedio de +/- SD, \*P < 0,05 vs. grupo control.



(Fig. 7B) La expresión del gen Mnf1 en el músculo *Tibialis,* no presentó diferencias significativas entre los grupos BEP y control. Valores representan el promedio de +/- SD, \*P < 0,05 vs. grupo control.



(Fig 7C). La expresión del gen Mnf1 en el músculo *Soleus* es mayor en el grupo BEP en comparación con el grupo control. Este aumento fue estadísticamente significativo. Valores representan el promedio de +/- SD, \*P < 0,05 vs. grupo control.

# DISCUSIÓN

El objetivo de esta investigación fue determinar los efectos del consumo de alcohol de patrón Binge Drinking o tipo atracón en el control glicémico, observar la existencia de posibles cambios morfológicos asociados y determinar cambios inducidos por el alcohol en la expresión de genes determinantes de la dinámica mitocondrial; todo esto para dar primeras luces sobre el efecto que produce este tipo de consumo en el músculo esquelético. Los músculos objetivo que fueron utilizados son *Soleus*, *Gastrocnemius* y *tibialis*. El contenido de fibras de cada músculo analizado puede ordenarse en tres grupos. *Soleus* con predominancia de fibras lentas oxidativas, *Gastrocnemius* con una composición mixta y el músculo *Tibialis* mixta-glucolítica. (Armstrong & Phelps, 1984)

Es sabido que los efectos del consumo de alcohol reportados corresponden la mayoría a estudios realizados sobre patrones de consumo crónico, los cuales muestran que bajo el influjo constante de alcohol se atenúa la acción de la insulina (Steiner & Lang, 2015) reduciendo el consumo de glucosa por parte del músculo esquelético, fenómeno conocido como resistencia insulínica músculo esquelética. También, bajo ciertas circunstancias, reduce el contenido de proteínas musculares y su síntesis normal (síndrome conocido como miopatía inducida por alcohol). A nivel mitocondrial se ha reportado que el tamaño y/o número de éstas, puede estar disminuido en humanos con uso crónico de alcohol. (Song & Rubin 1972; Urbano-Márquez, Fernández-Sola, 2004; Kiessling et al., 1975). Diversos estudios sobre el patrón de consumo crónico indican que se producen alteraciones en distintos parámetros metabólicos y bioquímicos. Estos se evidencia en los estudios de **(de Brito-Filho et al., 2016**) , donde el peso de las ratas alcoholizadas reportaron un aumento al comparar sus IMC con el grupo control. Esto se debería porque el consumo crónico de alcohol generaría un desbalance calórico que se traduciría en aumento del tejido adiposo y con el consiguiente aumento de peso. Este aumento de peso se asocia al impacto en el metabolismo de ácidos grasos que produce esta sustancia, donde a través de la inhibición de la β-oxidación y de otros factores se produce una alteración del metabolismo de lípidos, al verse alteradas las vías metabólicas hepáticas implicadas en la degradación del alcohol. (Kachani, Brasiliano & Hochgraf, 2008)

Los resultados de nuestro estudio muestran que las ratas sometidas al protocolo binge drinking presentaron un menor peso, el cual se mantuvo de manera prolongada en el tiempo, sin poder alcanzar nunca el peso que mantuvieron las ratas del grupo control. Por lo tanto este cambio en el peso desde el inicio del tratamiento con alcohol provocó en la comparación final de ambos grupos las diferencias observadas. Esto difiere notablemente con el efecto de consumo crónico de alcohol, donde el peso se ve aumentado a lo largo del tiempo, siendo el aumento de tejido adiposo uno de los responsables de esta característica. El posible factor que provoca esta acumulación de tejido adiposo podría estar vinculado con la alteración de las vías metabólicas hepáticas implicadas en la degradación del alcohol.

En esta investigación se observó que las ratas sometidas al protocolo binge drinking mantuvieron la característica de aumento en el tejido adiposo al igual que ocurre en los patrones de consumo crónico, por lo tanto puede existir desde etapas tempranas en el consumo de alcohol alteraciones que impliquen a las vias responsables de la acumulacion de tejido adiposo. Sin embargo, a pesar de este aumento en el tejido adiposo, las ratas que fueron sometidas al protocolo binge drinking en este estudio, tuvieron un menor peso al ser contrastadas con las ratas del grupo control. Por lo anteriormente expuesto se podría suponer que el bajo peso de las ratas alcoholizadas no es por la cantidad de tejido adiposo, pues se encuentra igualmente aumentado en consumo crónico y binge drinking, sino que podría deberse a la disminución de proteínas musculares asociada o no, con una falla en la transducción de señales generada directamente por el atracón de alcohol. Según la literatura el consumo crónico de alcohol reduce el contenido de proteínas musculares y la síntesis de proteínas preferentemente en las miofibras de tipo II, alterando varios componentes de la maquinaria sintética de proteínas y sus vías de transducción de señales. (Hanid et al., 1981; Preedy, 1991).

Por otra parte el fuerte consenso de los modelos *in vitro* y *ex vivo*, sugiere que el alcohol inhibe la secreción de insulina (Steiner, Crowell, Lang, 2015) lo que se podría presumir un aumento de la glicemia en bebedores regulares de alcohol. Estudios diversos sobre administración del alcohol muestra resultado discordantes en relación a la captación de glucosa por parte de los músculos, pero todos indican una reducción en la absorción de glucosa. Este fenómeno está descrito en la literatura y es conocido como resistencia a la insulina músculo esquelética. (Wasserman, 2009; Shelmet, 1988). Nuestros resultados sugieren que las concentraciones de glucosa en sangre medidas con PTGO fueron mayores en las ratas sometidas al tratamiento de alcohol tipo atracón, post administración del protocolo, alcanzando una mayor concentracion de glucosa en sangre en comparación a la primera medicion realizada antes de que fueran sometidas a dicho protocolo. Este hallazgo es relevante pues presume entonces que existe una alteración en lo que se refiere al metabolismo de la insulina entre el consumo crónico y el tipo atracón. Este efecto es descrito en la literatura, donde se afirma que esta inhibición puede ser por baja fosforilación del receptor de insulina, sustrato receptor de insulina 1 (IRS-1) y/o Akt. (Nguyen et al; 2012)

La literatura afirma una disminución en la síntesis de proteínas musculares producidas por el consumo de alcohol (Steiner, Lang, 2015). La disminución en la señalización de la insulina provocada por el alcohol y la baja en la captación de glucosa por parte del músculo esquelético estarían asociados al consumo de alcohol. (Steiner, Crowell, Lang, 2015) Con lo anterior se puede deducir que el papel de las mitocondrias y sus posibles alteraciones juegan un rol importante en estos cambios.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que bajo la administración de un protocolo de alcohol tipo binge drinking en ratas, aumentan los niveles de expresión de los genes involucrados en la dinámica mitocondrial Mnf1, Opa1 y Fis1; en los músculos *Soleus* y *Gastrocnemius*. Estos resultados difieren con la literatura que estudia el consumo crónico de alcohol (Steiner, Lang, 2015), donde asegura que ratas tratadas con alcohol presentan una inhibición de la fusión mitocondrial y su conectividad, evento posiblemente producido por la disminución de Mnf1. Este fenómeno entonces podría ocurrir como una respuesta temprana por parte de las células musculares ante la exposición de alcohol en grandes cantidades y por un corto periodo de tiempo.

Estos resultados sugieren que el patrón de consumo binge drinking puede tener un impacto directo sobre la estructura y/o cantidad de proteínas en el músculo esquelético. Si bien este estudio demostró un aumento en la expresión de estos genes, no se sabe con certeza cómo impacta en la producción de proteínas. Por esto, el desbalance producido por el alcohol sobre la fusión y fisión mitocondrial en la célula muscular dependerá del tiempo y el patrón de consumo al cual se exponga, pudiendo así observar los diferentes cambios asociados.En la misma investigacion de Steiner y Lang (Steiner, Lang, 2015), se señala que las alteraciones en la estructura y función de la mitocondria llevarían al músculo esquelético a vías de predominancia catabólica, provocando una sensibilización por parte del mismo músculo a esta condición, efecto que se reflejaría en una respuesta aumentada ante agentes o señales de esta naturaleza. Cabe destacar que este efecto es similar al que ocurre durante el envejecimiento. En nuestros resultados se observa un aumento de la expresión de Fis1 en ***gastrocnemius*, *soleus*** y una tendencia al aumento en *tibialis*, por lo que se esperaría un aumento del proceso de fisión mitocondrial en estos músculos. Por lo anterior, este aumento de la expresión del gen Fis1 podría indicar un comportamiento celular dirigido hacia vías de autofagia (mitofagia) o apoptosis; acabando finalmente en degradación miofibrilar.

En nuestra investigación no se realizó una diferenciación entre los tipos de fibra que podíamos encontrar en cada muestra analizada. En este caso los músculos *Soleus*, *Gastrocnemius y Tibialis* no reportan el porcentaje correspondiente a fibras tipo I o II, por lo tanto no podemos asegurar que tipo de fibra se ve más afectada. Esto es señalado producto que en el consumo crónico el tiempo de consumo de alcohol es notablemente diferente, y el efecto negativo que se ve en el músculo predomina claramente sobre las fibras tipo II.

#

# CONCLUSIONES

Binge Drinking aumenta la acumulacion de tejido graso epididimal y retroperitoneal. Además disminuye el peso corporal en ratas, después de la exposición al protocolo de alcohol.

BD causa un aumento en la glucosa en sangre en comparación con el grupo de control, medida con PTGO.

BD aumenta la expresión de los genes Fis1, Mfn1 y Opa1 en los músculos ***Gastrocnemio y Soleus.***

Los resultados anteriores nos entregan los primeros indicios sobre el efecto fisiológico que tiene el consumo de tipo atracón en el músculo esquelético. En este trabajo se observó que el peso de las ratas sometidas al protocolo binge Drinking presentan un menor valor, lo que diferiría notablemente con el efecto de consumo crónico de alcohol. Por otra parte el tejido adiposo se encuentra aumentado en las ratas BD, efecto que también observado en bebedores crónicos.

A nivel mitocondrial observamos aumentos de precursores de fusión (Mfn1; Opa1) y fisión (Fis1) en los músculos gastrocnemio y sóleo; por otra parte Opa-1 se encuentra aumentado en el músculo tibialis.

Finalmente debemos precisar que a pesar de que el protocolo administrado podría ser mejorado, este estudio abordó un fenómeno cuyas consecuencias nos son aún desconocidas, y presenta las primeras bases para poder precisar cuáles son los efectos reales que produce este patrón de consumo el cuerpo.

# ANEXOS

## Metabolismo del Alcohol

El alcohol es una fuente de energía diferente de todas las otras, pues no puede ser almacenado en el organismo. Como sustancia tóxica, se debe eliminar inmediatamente. El alcohol tiene prioridad en el metabolismo, alterando otras vías metabólicas, incluyendo la oxidación lipídica, lo que favorece la acumulación de grasas en el organismo, que se depositan preferentemente en el área abdominal (Lands, 1993, Suter et al., 1997, Suter, 2005).

La participación calórica del alcohol depende de su forma de metabolización, la principal y más usual vía de metabolización del alcohol es aquella que involucra la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), cuya función es la oxidación del etanol en acetaldehído. Esta vía utiliza el NAD (dinucleótido de nicotinamida-adenina) como aceptor de hidrógeno, que se reduce a NADH. Esta reacción está asociada con un alto suministro energético proveniente del NADH en la formación de 16 ATP/mol de etanol vía fosforilación oxidativa. La disponibilidad de NAD y la actividad mitocondrial limitan el uso de esa vía, más utilizada por bebedores sociales (Mitchell y Herlong, 1986; Suter et al., 1997; Aguiar et al., 2007).

La vía metabólica del alcohol que asume gran relevancia en sujetos alcohólicos es aquella del Sistema Mitocondrial de Oxidación del Etanol (MEOS), presente en el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos, que utiliza el citocromo P-450, la NADPH-citocromo reductasa y los fosfolípidos, teniendo como aceptor de hidrógeno el NADP. Esta vía tiene mayor importancia en individuos que consumen el alcohol crónicamente, pero a costa de gasto de energía en la forma de ATP. Utiliza el oxígeno y el NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida), no generando componentes formadores de energía, como el NADH. Es, por lo tanto, una reacción que consume energía, en lugar de generarla (Mitchell y Herlong, 1986; Aguiar et al., 2007).

Existe una tercera vía de metabolización del etanol que tiene pequeña participación en el proceso, siendo responsable de sólo el 10% del alcohol ingerido. Se produce en el interior de los peroxisomas, a través de catalasas, y, semejante al MEOS, no forma ATP (Aguiar et al., 2007).

Las tres vías tienen como producto final el acetaldehído, que será oxidado en acetato y agua por el aldehído deshidrogenasa (ALDH), enzima presente en la matriz y en la membrana mitocondrial externa, microsistemas y en el citosol de los hepatocitos. En la fase final del metabolismo, el acetato se convierte en coenzima A, con desdoblamiento de ATP a AMP (adenosina monofosfato). El AMP podrá entonces ser convertido nuevamente en ATP o en purinas y ácido úrico. El acetil coenzima A, a su vez, entrará en el Ciclo de Krebs, transformándose en dióxido de carbono y agua (Aguiar et al., 2007). Por lo tanto, el acetato, metabolito final de la degradación del alcohol, es una gran forma de energía, inhibiendo la oxidación lipídica y causando, entre otras cosas, la esteatosis hepática y la obesidad (Suter et al., 1997).

# Referencias bibliográficas

Alcohol and Nutrition: Caloric Value, Bioenergetics, and Relationship to Liver Damage. (1986). *Annual Review Of Nutrition*, *6*(1), 457-474. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nu.06.070186.002325>

Amchenkova, A.A., Bakeeva, L.E., Chentsov, Y.S., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (1988) Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. J Cell Biol 107:481-495. 99.

Aguiar, A.S.; da Silva, V.A.; Boaventura, G.T. (2007)- As calorias do etanol são aproveitadas pelo organismo? Nutrição em Pauta jan/fev: 45-49.

Armstrong, R., & Phelps, R. (1984). Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *American Journal Of Anatomy*, *171*(3), 259-272. http://dx.doi.org/10.1002/aja.1001710303

Avogaro, A., & Tiengo, A. (1993). Alcohol, glucose metabolism and diabetes. *Diabetes / Metabolism Reviews*, *9*(2), 129-146. <http://dx.doi.org/10.1002/dmr.5610090205>

Boden, G.; Chen, X.; Desantis, R.; White, J.; Mozzoli, M.  (1993) Effects of ethanol on carbohydrate metabolism in the elderly. Diabetes  42, 28–34.,

Centro de Políticas Públicas UC. (2015). *El consumo riesgoso de alcohol en Chile: tareas pendientes y oportunidades para las políticas públicas*. Retrieved from [https://politicaspublicas.uc.cl/wp-content//uploads/2015/03/N%C2%B0-75-El-consumo-riesgoso-de-alcohol-en-Chile.pdf](https://politicaspublicas.uc.cl/wp-content/uploads/2015/03/N%C2%B0-75-El-consumo-riesgoso-de-alcohol-en-Chile.pdf)

Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial

heterogeneity and dysfunction. Journal of Biological Chemistry 280:26185-26192

Chen, H., and Chan, D.C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. Hum Mol Genet 14 Spec No. 2:R283-289.

Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., y Chan, D.C. (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. The Journal of Cell Biology 160:189-200

Cipolat, S., De Brito, O.M., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:15927-15932.

**Cuervo Orozco, W. (2017). ESTUDIO DESCRIPTIVO DE INTOXICACIONES POR ETANOL NOTIFICADAS EN BOGOTÁ D.C., ENTRE LOS AÑOS 2008 AL 2016.**

Crouse, J.R.; Gerson, C.D.; De Carli, L.M.; Lieber, C.S .(1968)  Role of acetate in the reduction of plasma free fatty acids produced by ethanol in man. J. Lipid Res., 9, 509–512.

Cook, E.B.; Adebiyi, L.A.; Preedy, V.R.; Peters, T.J.; Palmer, T.N. (1992) Chronic effects of ethanol on muscle metabolism in the rat. Biochim. Biophys. Acta 1180, 207–214.,

Dittmar, E.A.; Hetenyi, G., Jr. The effect of ethanol on glucose homeostasis. Can. J.

Physiol. Pharmacol. 1978, 56, 54–61.

DeFronzo, R.A.; Jacot, E.; Jequier, E.; Maeder, E.; Wahren, J.; Felber, J.P. (1981) The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. Diabetes, 30, 1000–1007

Detmer, S., & Chan, D. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(11), 870-879. http://dx.doi.org/10.1038/nrm2275

**De BRITO-FILHO, S., de MOURA, E., dos SANTOS, O., SAUAIA-FILHO, E., AMORIM, E., & SANTANA, E. et al. (2016). *EFFECT OF CHRONIC INGESTION OF WINE ON THE GLYCEMIC, LIPID AND BODY WEIGHT HOMEOSTASIS IN MICE*.**

Dohm, J., Lee, S., Hardwick, J., Hill, R. and Gittis, A. (2003). Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein fis1 adopts a TPR fold. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, [online] 54(1), pp.153-156. Available at: https://doi.org/10.1002/prot.10524 [Accessed 17 Apr. 2018].

Eckardt, M., File, S., Gessa, G., Grant, K., Guerri, C., & Hoffman, P. et al. (1998). Effects of Moderate Alcohol Consumption on the Central Nervous System\*. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research*, *22*(5), 998-1040. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.1998.tb03695.x>

Glucose tolerance and B cell function in chronic alcoholism: Its relation to hepatic histology and exocrine pancreatic function. (1983). *Metabolism*, *32*(11), 1029-1032. http://dx.doi.org/10.1016/0026-0495(83)90072-0.

Griparic, L., Kanazawa, T., and Van Der Bliek, A.M. (2007). Regulation of the mitochondrial dynaminlike protein Opa1 by proteolytic cleavage. Journal of Cell Biology 178:757-764.

Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstones, C., Lombès, A., Belenguer, P., Arnoult, D., and Rojo, M. (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. Biology of the Cell 100:315-325.

Haller RG, Knochel JP. (1984). Skeletal muscle disease in alcoholism. Med Clin North Am 68:91–103

Hanid, A., Slavin, G., Mair, W., Sowter, C., Ward, P., Webb, J., & Levi, J. (1981). *Fibre type changes in striated muscle of alcoholics*. Retrieved 17 April 2018.

Ishihara, N., Eura, Y., and Mihara, K. (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. Journal of Cell Science 117:6535-6546.

Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. EMBO Journal 25:2966-2977

Klinkerfuss, G. (1967). A Spectrum of Myopathy Associated with Alcoholism. *Annals of Internal Medicine*, [online] 67(3\_Part\_1), p.493. Available at: http://annals.org/aim/article-abstract/681719/spectrum-myopathy-associated-alcoholism-ii-light-electron-microscopic-observations [Accessed 17 Apr. 2018].

Kim, I., Rodriguez- Enriquez, S. and Lemasters, J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, [online] 462(2), pp.245-253. Available at: https://academicdepartments.musc.edu/ccdir/Kim.pdf [Accessed 17 Apr. 2018].

Kreisberg, R.A.; Owen, W.C.; Siegal, A.M. (1971) Ethanol-induced hyperlacticacidemia:

Inhibition of lactate utilization. J. Clin. Investig., 50, 166–174.

Kachani, A., Brasiliano, S., & Hochgraf, P. (2008). *The impact of alcohol consumption on weight gain*. Retrieved 17 April 2018, from

Lands, W. (1993). A Summary of the Workshop “Alcohol and Calories: A Matter of Balance”. *The Journal Of Nutrition*, *123*(7), 1338-1341. <http://dx.doi.org/10.1093/jn/123.7.1338>

Lang, C., Derdak, Z., & Wands, J. (2014). Strain-Dependent Differences for Suppression of Insulin-Stimulated Glucose Uptake in Skeletal and Cardiac Muscle by Ethanol. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research*, *38*(4), 897-910. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.12343>

Lang, C.H.; Frost, R.A.; Summer, A.D.; Vary, T.C. (2005) Molecular mechanisms responsible for alcohol induced myopathy in skeletal muscle and heart. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37, 2180–2195.

Lang, C.H.; Dobrescu, C.; Meszaros, K. (1990) Insulin-mediated glucose uptake by individual tissues during sepsis . Metabolism 39, 1096–1107.

Lee, S., Jeong, S.Y., Lim, W.C., Kim, S., Park, Y.Y., Sun, X., Youle, R.J., and Cho, H. (2007) Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. Journal of Biological Chemistry 282:22977-22983.

Legros, F., Lombès, A., Frachon, P., and Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. Molecular Biology of the Cell 13:4343-4354.

Liu, X., Weaver, D., Shirihai, O., and Hajnoczky, G. (2009) Mitochondrial /`kiss-and-run/': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. EMBO J 28:3074-3089

Lieber. (1988). The Influence of Alcohol on Nutritional Status. Bronx.

Lodi, R., Tonon, C., Valentino, M.L., Iotti, S., Clementi, V., Malucelli, E., Barboni, P., Longanesi, L., Schimpf, S., Wissinger, B., et al. (2004). Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in OPA1- related dominant optic atrophy. Ann Neurol 56:719-723.

Lochner, A., Wulff, J., & Madison, L. (1967). Ethanol-induced hypoglycemia. *Metabolism*, *16*(1), 1-18. [http://dx.doi.org/10.1016/0026-0495(67)90154-0](http://dx.doi.org/10.1016/0026-0495%2867%2990154-0)

Madison, L., Lochner, A., & Wulff, J. (1967). Ethanol-induced Hypoglycemia: II. Mechanism of Suppression of Hepatic Gluconeogenesis. *Diabetes*, *16*(4), 252-258. <http://dx.doi.org/10.2337/diab.16.4.252>

Molina, P.E.; Lang, C.H.; Bagby, G.J.; Spitzer, J.J. (1991) Ethanol oxidation is not required to attenuate endotoxin- enhanced glucose metabolism. Am. J. Physiol, 260, R1058–R1065..

Manthou, E., et al (2016). Role of exercise in the treatment of alcohol use disorders. *Biomedical Reports*, *4*(5), 535-545. <http://dx.doi.org/10.3892/br.2016.626>

MINSAL. (2010). *Encuesta Nacional de Salud (ENS)*.

MINSAL. (2011). *Intervenciones breves para reducir el consumo de alcohol de riesgo*

Nguyen, V.A.; Le, T.; Tong, M.; Silbermann, E.; Gundogan, F.; de la Monte, S.M. (2012) Impaired insulin/IGFsignaling in experimental alcohol-related myopathy. Nutrients  4, 1058–1075

Nunnari, J., Marshall, W., Straight, A., Murray, A., Sedat, J., and Walter, P. (1997) Mitochondrial transmission during mating in Saccharomyces cerevisiae is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. Mol. Biol. Cell 8:1233-1242.

Organización Panamericana de la Salud. (2015). *Informe sobre la situación regional sobre el alcohol y la salud en las Américas.*

Organización Panamericana de la Salud. (2007). *Alcohol y salud pública en las Américas: un caso para la acción.*. Biblioteca Sede OPS - Catalogación en la fuente.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2010). *Estrategias para reducir el uso nocivo del alcohol: proyecto de estrategia mundial*.

Organización Panamericana de la Salud. (2008). *Alcohol y atención primaria de la salud: informaciones clínicas básicas para la identificación y el manejo de riesgos y problemas.*.

Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. Journal of Biological Chemistry 278:7743-7746.

Onoue, K., Jofuku, A., Ban-Ishihara, R., Ishihara, T., Maeda, M., Koshiba, T., Itoh, T., Fukuda, M., Otera, H., Oka, T., Takano, H., Mizushima, N., Mihara, K. and Ishihara, N. (2012). Fis1 acts as a mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that is involved in regulation of mitochondrial morphology. *Journal of Cell Science*, [online] 126(1), pp.176-185. Available at: http://DOI: 10.1242/jcs.111211 ·

Parone, P., Da Cruz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D., Maechler, P., Barja, F. and Martinou, J. (2008). Preventing Mitochondrial Fission Impairs Mitochondrial Function and Leads to Loss of Mitochondrial DNA. *PLoS ONE*, 3(9), p.e3257. [Accessed 17 Apr. 2018].

Palmer, T. (1991). *Alcoholism* (pp. 253-267). Boston, MA: Springer US.

Preedy, V. R., Ohlendieck, K., Adachi, J., Koll, M., Sneedon, A., Hunter, R., et al. (2003). The importance of alcohol-induced muscle disease. *Journal of Muscle and Cell Motility*, *24*, 55–63.

Quantitative analysis of intermediary metabolism in rat hepatocytes incubated in the presence and absence of ethanol with a substrate mixture including ketoleucine. (1989). *Biochemical Journal*, *258*(1), 121-140. <http://dx.doi.org/10.1042/bj2580121>

Role of insulin in the regulation of human skeletal muscle protein synthesis and breakdown: a systematic review and meta-analysis (2015). Haitham Abdulla & Kenneth Smith & Philip J. Atherton & Iskandar Idris

Santel, A., and Fuller, M.T. (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. Journal of Cell Science 114:867-874.

Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R.J., and Fuller, M.T. (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. Journal of Cell Science 116:2763-2774.

Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y., and Endo, H. (2003) Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. Biochemical and Biophysical Research Communications 300:482-493

SENDA-MINSAL. (2016). *El consumo de alcohol en Chile: Situación Epidemiológica*.

Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol, SENDA. (2014). *Décimo Primer Estudio Nacional de Drogas en Población General de Chile 2014*. Santiago, Chile.

Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA). (2013). *Décimo Estudio Nacional de Drogas en Población Escolar*.

Steiner, J., & Lang, C. (2015). Dysregulation of skeletal muscle protein metabolism by alcohol. *American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, *308*(9), E699-E712. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00006.2015>

Steiner, J., Crowell, K., & Lang, C. (2015). Impact of Alcohol on Glycemic Control and Insulin Action. *Biomolecules*, *5*(4), 2223-2246. <http://dx.doi.org/10.3390/biom5042223>

Suter, P., Hasler, E., & Vetter, W. (1997). Effects of alcohol on energy metabolism and body weight regulation: is alcohol a risk factor for obesity?. *Nutr Rev*, *55*(5), 157-71.

Suter, P., & Tremblay, A. (2005). IS ALCOHOL CONSUMPTION A RISK FACTOR FOR WEIGHT GAIN AND OBESITY?. *Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences*, *42*(3), 197-227. <http://dx.doi.org/10.1080/10408360590913542>

Spolarics, Z.; Bagby, G.J.; Pekala, P.H.; Dobrescu, C.; Skrepnik, N.; Spitzer, J.J. (1994) Acute alcohol administration attenuates insulin-mediated glucose use by skeletal muscle. Am. J. Physiol., 267,E886–E891.

Schrieks IC, Heil AL, Hendriks HF, Mukamal KJ, & Beulens JW. (2015). The effect of alcohol consumption on insulin sensitivity and glycemic status: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. http://dx.doi.org/doi: 10.2337/dc14-1556.

Shelmet, J., Reichard, G., Skutches, C., Hoeldtke, R., Owen, O., & Boden, G. (1988). Ethanol causes acute inhibition of carbohydrate, fat, and protein oxidation and insulin resistance. *Journal Of Clinical Investigation*, *81*(4), 1137-1145. <http://dx.doi.org/10.1172/jci113428>

Song, S. and Rubin, E. (1972). Ethanol Produces Muscle Damage in Human Volunteers. *Science*, 175(4019), pp.327-328.

Suen, D., Norris, K. and Youle, R. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & Development*, [online] 22(12), pp.1577-1590. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559474>.

**The Solution Structure of Human Mitochondria Fission Protein Fis1 Reveals a Novel TPR-like Helix Bundle. (2003). *Journal of Molecular Biology*, [online] 334(3), pp.445-458. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.064**

**The inhibition of gluconeogenesis following alcohol in humans. (1998). *American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, *275*(5), E897-E907.** [**http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.1998.275.5.e897**](http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.1998.275.5.e897)

Tiengo, A.; Valerio, A.; Molinari, M.; Meneghel, A.; Lapolla, A. (1981) Effect of ethanol, acetaldehyde, and acetate on insulin and glucagon secretion in the perfused rat pancreas. Diabetes, 30, 705–709..

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. EMBO J 27:433-446.

Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., et al. (2009). SlP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. EMBO Journal 28:1589-1600

[Urbano-Márquez A](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Urbano-M%C3%A1rquez%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15490485)1, [Fernández-Solà J](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Fern%C3%A1ndez-Sol%C3%A0%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15490485). Effects of alcohol on skeletal and cardiac muscle. (2004). *Muscle & Nerve*, 30(6), pp.689-707.

Urbano-Marquez, A., Estruch, R., Navarro-Lopez, F., Grau, J., Mont, L. and Rubin, E. (1989). The Effects of Alcoholism on Skeletal and Cardiac Muscle. *New England Journal of Medicine*, 320(7), pp.409-415.

Wasserman, D.H. (2009) Four grams of glucose. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 296, E11–E21.

Williams, H. (1984). Alcoholic Hypoglycemia and Ketoacidosis. *Medical Clinics Of North America*, *68*(1), 33-38. http://dx.doi.org/10.1016/s0025-7125(16)31239-1

World Health Organization. (2014). *Global status report on alcohol and health*.

Xu, D.; Dhillon, A.S.; Davey, C.G.; Fournier, P.A.; Palmer, T.N. (1996) Alcohol and glucose metabolism in skeletal muscles in the rat. Addict.Biol. 1, 71–83.;

Yki-Jarvinen, H., Koivisto, V., Ylikahri, R., & Taskinen, M. (1988). Acute effects of ethanol and acetate on glucose kinetics in normal subjects. *American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, *254*(2), E175-E180. http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.1988.254.2.e175.

Zorzano A., Jessica Segalés, María Isabel Hernandez-Álvarez, Eleonora Sorianello.(2012). Dinámica mitocondrial y sus implicaciones en la desregulación metabólica y en la neurodegeneración. Cap VIII. Institut for Research in Biomedicine (IRB Barcelona) c/Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain.