

Ensayos

Análisis del efecto del consumo crónico de alcohol en el desarrollo de resistencia a la insulina ligada a una posible alteración en los niveles de adiponectina en sangre

Resumen

El lipopolisacárido es el principal componente de la pared celular de todas las bacterias Gram negativas, las cuales forman parte de la flora intestinal. Se ha establecido que en los humanos, el consumo excesivo de alcohol está asociado con una aparición transitoria de lipopolisacárido en la circulación sanguínea de personas sanas. Los monocitos y los macrófagos presentes de manera abundante en el bazo, son las principales células que unen al lipopolisacárido a través del receptor TLR4, esto desencadena una gran producción de citocinas inflamatorias como el TNF- α , IL-1 e IL-6. Estudios recientes han demostrado que el TNF- α reduce la expresión de la adiponectina. La adiponectina es una hormona producida principalmente por el tejido adiposo, necesaria para evitar la resistencia a la insulina. El objetivo de este trabajo, fue estudiar el efecto del consumo crónico de alcohol, en el desarrollo de resistencia a la insulina ligada a una posible alteración en los niveles de adiponectina en sangre.

Abstract

Lipopolysaccharide is the main component of the cellular wall of all Gram-negative bacteria, which are part of the intestinal flora. It has been established that excessive consumption of alcohol by humans is related to a transient occurrence of Lipopolysaccharide in the blood circulation of healthy people. Monocytes and macrophages, abundantly present in the spleen, are the main cells that unite the Lipopolysaccharide through the TLR4 receptor. This triggers a large production of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 and IL-6. Recent studies have demonstrated that TNF- α reduces the expression of adiponectin. Adiponectin is a hormone produced mainly by the adipose tissue, which is needed to avoid insulin resistance. The objective of this research was to study the effect of chronic alcohol consumption in the development of insulin resistance linked to a possible change in adiponectin levels in the blood.

Résumé

Le lipopolysaccharide est le principal composant de la paroi cellulaire de toutes les bactéries Gram négatives qui forment partie de la flore intestinale. Il a été établi que chez les humains, la consommation excessive d'alcool est associée à une apparition transitoire de lipopolysaccharide dans la circulation sanguine de personnes saines. Les monocytes et macrophages présents de manière abondante dans la rate, sont les principales cellules qui unissent le lipopolysaccharide par l'intermédiaire du récepteur TLR4, ce qui provoque une grande production de cytokines inflammatoires comme le TNF- α , IL-1 et IL-6. Des études récentes ont montré que le TNF- α réduit l'expression de l'adiponectine. L'adiponectine est une hormone produite principalement par le tissu adipeux et qui est nécessaire pour éviter la résistance à l'insuline. L'objectif de ce travail a été d'étudier l'effet de la consommation chronique d'alcool, dans le développement de résistance à l'insuline liée à une possible altération dans les niveaux d'adiponectine dans le sang.

Joel Cerna Cortés¹,
Jorge Francisco Cerna Cortés²,
Alberto Jiménez Maldonado³,
Rosa del Carmen Meza Robles¹,
Víctor Hugo Cervantes Kardasch¹,
Alin Palacios Fonseca¹,
Bertha Alicia Olmedo Buenrostro¹,
Xochitl Trujillo Trujillo³,
Sergio Adrian Montero Cruz¹

¹ Facultad de Medicina, Universidad de Colima.

² Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

³ Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima.

Introducción

El alcoholismo es un problema común entre diversos grupos de gente joven (Francis, Grosskurth, Changalucha, Kapiga, Weiss, 2014), su consumo está asociado con un nivel elevado de mortalidad debido a problemas secundarios ligados a la enfermedad hepática (Roman, Zepeda-Carrillo, Moreno-Luna, Panduro, 2013). En los pacientes alcohólicos la enfermedad de hígado se ha atribuido al elevado nivel de citocinas inflamatorias (McClain, Barve, Deaciuc, Kugelmas, Hill, 1999). El presente trabajo de investigación se apoya en el hecho de que el consumo de alcohol estimula la translocación del lipopolisacárido LPS a través del intestino (Fukui, Brauner, Bode, Bode, 1991). Esta molécula es el principal componente de la pared celular de todas las bacterias Gram negativas, y es capaz

de mimetizar una infección bacteriana y provocar una respuesta inflamatoria aguda. La translocación del LPS a través de la barrera epitelial del intestino se ha descrito como una difusión simple a través de las uniones estrechas entre las células adyacentes (Keshavarzian, Farhadi, Forsyth, Rangan, Jakate, Shaikh, Banan, Fields, 2009). Se ha demostrado que las personas con ingestión crónica de alcohol presentan un sobrecrecimiento de la microflora respecto a los individuos que no consumen alcohol (Artis 2008; Hauge, Persson, Danielsson, 1997). Lo anterior trae como resultado para las personas alcohólicas una mayor producción de LPS por parte de las bacterias Gram negativas y un incremento en la translocación de este compuesto hacia la sangre (Artis, 2008; Kirpich, Solovieva, Leikhter, Shidakova, Lebedeva, Sidorov, Bazhukova, Soloviev, Barve, McClain, Cave, 2008; Mutlu, Keshavarzian, Engen, Forsyth, Sikaroodi, Gillevet, 2009). Las principales células que unen al LPS son los macrófagos y los monocitos a través de la estimulación principalmente del receptor TLR4 lo cual activa una cascada de señalización intracelular que provoca la producción y liberación de citocinas tales como TNF- α , IL-1, IL-6, e IL-10 (Van der Bruggen, Nijenhuis, Van Raaij, Verhoef, Van Asbeck, 1999). Estas citocinas producen un estado oxidativo que provoca un daño al tejido del huésped (Mittal, Siddiqui, Tran, Reddy, Malik, 2014). El hígado contiene una gran cantidad de macrófagos, llamados células Kupffer, mientras que el bazo es un reservorio de una gran cantidad de monocitos, los cuales están listos para contactar el LPS y fagocitar a las bacterias que se encuentran contaminando la sangre (Swirski, Nahrendorf, Etzrodt, Wildgruber, Cortez-Retamozo, Panizzi, Figueiredo, Kohler, Chudnovskiy, Waterman, Aikawa, Mempel, Libby, Weissleder, Pittet, 2009). La adiponectina, es una proteína sérica producida por el tejido adiposo blanco (Fu, Luo, Klein, Garvey, 2005), la cual participa en la homeóstasis de la glucosa al actuar sobre hígado y músculo esquelético (Yamauchi, Kamon, Ito, Tsuchida, Yokomizo, Kita, Sugiyama, Miyagishi, Hara, Tsunoda, Murakami, Ohteki, Uchida, Takekawa, Waki, Tsuno, Shibata, Terauchi, Froguel, Tobe, Koyasu, Taira, Kitamura, Shimizu, Nagai, Kadowaki, 2003). Esta adipocina previene la aterosclerosis (Lihn, Pedersen, Richelsen, 2005).

Se ha observado que los niveles de la adiponectina son bajos en individuos obesos, en pacientes con diabetes tipo 2 y en aquéllos quienes presentan resistencia a la insulina (Lihn et al 2005). Estudios recientes han demostrado que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) disminuye la expresión de la adiponectina en los adipocitos, ya que esta adipocina impide que el factor de transcripción C/EBP-beta se una al promotor de esta citocina (Kita, Yamasaki, Kuwahara, Moriuchi, Fukushima, Kobayashi, Fukushima, Takahashi, Abiru, Uotani, Kawasaki, Eguchi, 2005). El objetivo de este estudio fue evaluar si el consumo crónico de alcohol en ratas ocasiona una disminución de la concentración de la adiponectina en la sangre y esto favorece una resistencia a la insulina.

Desarrollo Materiales y métodos Animales

Los experimentos se realizaron con un grupo control de 10 ratas Wistar 5 hembras y 5 machos de 4 meses de edad. Los animales fueron alimentados a libre saciedad (*ad libitum*). Al inicio se procedió a cortar la cola de las ratas y a ordeñar de manera manual para obtener muestras de sangre la cual fue utilizada para realizar la determinación de glucosa y adiponectina. Posteriormente se les dio a beber agua con etanol al 14%, durante 6 semanas. En la literatura la dosis más alta administrada a ratas es del 30% pero en las condiciones de esta investigación a concentraciones de etanol por arriba del 14 % las ratas se resisten a consumir la solución alcohólica, por esa razón se decidió utilizar una concentración del 14% (Sari, Bell, Zhou, 2006; Venkatraman, Shiva, Davis, Bailey, Brookes, Darley-Usmar, 2003). Al terminar las seis semanas de tratamiento, se procedió nuevamente a cortar la cola de las ratas y a ordeñar de manera manual para obtener muestras de sangre y con ella realizar las determinaciones anteriormente mencionadas. En el manejo de los animales se siguieron las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 poniendo especial cuidado en lo referente a las instalaciones, analgesia y anestesia de los animales y en lo respectivo a la administración de fluidos y sustancias.

Medición de adiponectina

La medición sérica de adiponectina se llevó a cabo utilizando el kit abcam Adiponectin Rat elisa kit (ab108784) el cual contenía una placa de 96 pozos recubierta con un anticuerpo específico contra la adiponectina de rata. Los estándares y las muestras se colocaron en los pozos y se incubó durante una hora para permitir la unión de la adiponectina al anticuerpo específico. Se realizaron lavados y se adicionó un anticuerpo biotinilado dirigido contra la adiponectina en una de las placas. Después de lavar y retirar el exceso del anticuerpo biotinilado se adicionó estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano. Los pozos fueron lavados nuevamente y luego se adicionó el sustrato TMB. El color desarrollado fue proporcional a la concentración de adiponectina unida al anticuerpo. Se utilizó finalmente una solución que cambió el color azul al color amarillo, cuya intensidad fue medida a una longitud de onda de 450 nm con ayuda de un lector de ELISA (iMark microplate absorbance reader, BIO-RAD, Cat. 168-1130, Hercules, CA, U.S.A.) y la lectura de la absorbancia se realizó 30 min después de adicionar la solución “stop”.

Curva de tolerancia a la insulina

El análisis del efecto crónico del etanol en el desarrollo de resistencia a la insulina se realizó utilizando dos grupos de animales, uno que permaneció libre de consumo de bebida alcohólica y un grupo al que se le dió de beber etanol disuelto en agua a una concentración del 14% durante 6 semanas. Debido a que la administración peritoneal de insulina disminuye mucho los niveles de glucosa en sangre, la prueba de tolerancia a la insulina se realizó de manera posprandial, es decir, se permitió a los animales comer hasta el momento de realizar la prueba. Se midió la glucosa antes de aplicar la insulina con ayuda de un glucómetro marca Contour. Primeramente se procedió a cortar el extremo de la cola de la rata para obtener una gota de sangre y medir la glucosa. Posteriormente se aplicó 0.08 unidades de insulina (Humulin 100 UI/mL de la marca Eli Lilly y compañía de México S.A de C.V.) por inyección intraperitoneal por cada 100 gramos del peso de la rata y se midió la glucosa en ambos grupos de animales a los 0, 30, 60, 120 y 180 minutos post administración de la insulina.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media del error estándar (\pm EE). Todos los análisis estadísticos se realizaron, utilizando el software package SPSS 17.0. La prueba estadística utilizada para el análisis de adiponectina fue la de T-Student en la cual se consideró como una diferencia estadística cuando la p fue menor a 0.05. Las gráficas se obtuvieron utilizando el software GrahPad Prism.

Resultados

En la figura 1 puede apreciarse un promedio de adiponectina en suero de 99.40 ng / mL \pm 3.168 DE (desviación estándar) en el grupo control, contra un 96.13 ng/ mL \pm 1.462 DE del grupo tratado con etanol sin encontrar una diferencia estadística significativa $p=0.47$ (p es la probabilidad de error al comparar dos o más muestras o grupos cuando es seguro que ambos son diferentes. $p < 0.05$ significa que se tiene un 5% de probabilidades de error en las conclusiones).

Adiponectina plasmática

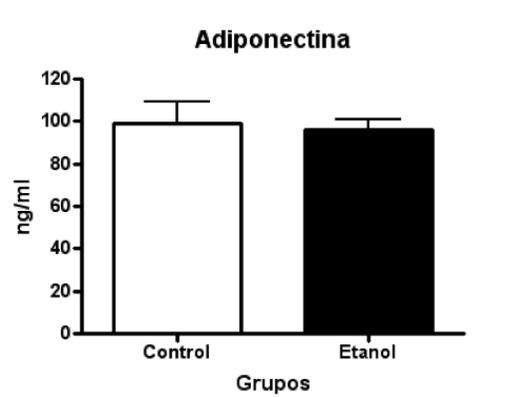


Figura 1. Análisis del consumo crónico de etanol en la liberación de insulina al torrente sanguíneo en ratas wistar.

La adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina y ayuda a disminuir los niveles de glucosa (Lihn et al 2005). Se procedió a analizar el efecto del consumo crónico de etanol en la sensibilidad a la insulina a través de una prueba de tolerancia a esta hormona. En la figura 2A se observó que la dinámica de concentraciones de glucosa no varió antes y después de administrar la carga de insulina en los grupos control y problema.

A) Prueba de Sensibilidad a la Insulina

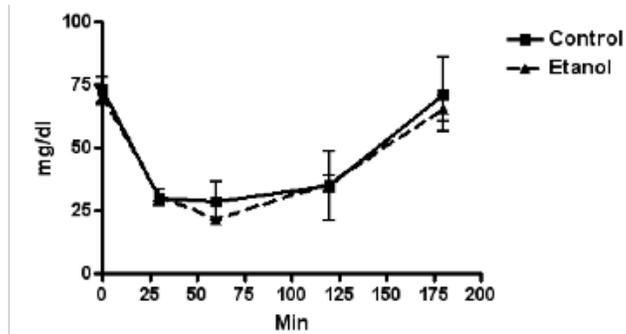
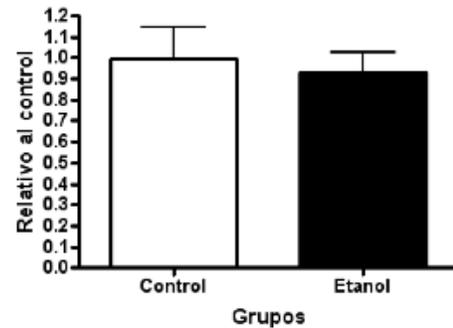


Figura 2. Prueba de sensibilidad a la insulina

2A) Dinámica de concentración de glucosa ante la administración intraperitoneal de insulina 0.08 unidades de insulina/100 gramos de peso. 2B) Cuantificación del área bajo la curva en unidades arbitrarias mediante el método trapezoidal.

B) Área Bajo la Curva



t test = 0.23

Media	1.000	0.9300
Desviación	0.1500	0.1000
Error estándar	0.04743	0.03162

Para realizar la cuantificación de la respuesta a la insulina durante la prueba de tolerancia a esta hormona, se obtuvo el área bajo la curva en unidades arbitrarias a través del método trapezoidal. En la figura 2B, se puede observar que el grupo control presenta un área bajo la curva de 7527 con una desviación estándar de 1165, mientras que el grupo problema presenta un área bajo la curva de 7064 con una desviación estándar de 726.5 sin presentar una diferencia estadística significativa $p=0.29$

Discusión

La inflamación está mediada principalmente por el sistema inmunológico innato, se trata de una respuesta fisiológica al daño que pueden sufrir los tejidos o como un proceso desencadenado por una infección (Matzinger, 2002; Medzhitov, 2008). Como respuesta ante estos estímulos, los macrófagos, liberan citocinas proinflamatorias que estimulan el reclutamiento de más macrófagos y neutrófilos al sitio de daño, incrementando la permeabilidad vascular tanto del plasma como de las proteínas plasmáticas (Tan y Kagan 2014).

El sistema inmunológico innato, mediado por los receptores tipo Toll (TLRs), es el principal mecanismo de defensa que protege a los animales de patógenos invasores. Los TLRs son una familia de receptores que reconocen moléculas patrón (pattern recognition receptors, PRRs), los cuales son activados durante una infección por un grupo de moléculas patrón asociadas a patógenos (pathogen-associated microbial patterns, PAMPs) como el lipopolisacárido LPS, así como mo-

léculas patrón asociadas a daño (damage associated molecular patterns, DAMPs).

Los TLRs al ser estimulados por su ligando, desencadenan una vía de señalización específica, en la cual participan moléculas adaptadoras y proteínas quinasas.

Esta vía de señalización activa la transcripción de una gran cantidad de genes que codifican citocinas inflamatorias tales como la IL-1 y el TNF- α , los cuales generan la respuesta inflamatoria. (Medzhitov, Preston-Hurlburt, Janeway, 1997)

En el tracto gastrointestinal habitan aproximadamente 1014 microorganismos, en su mayoría comensales (Artis 2008; Kelly, Conway, Aminov, 2005; Othman, Agüero, Lin, 2008; Mai y Draganov 2009). Como se mencionó en la introducción, el LPS es un componente de pared celular de las bacterias Gram negativas como la *Escherichia coli* que es el principal comensal que predomina en tracto gastrointestinal (Bentley y Meganathan 1982). En los humanos el consumo de alcohol está asociado con un incremento en la permeabilidad del LPS y de acuerdo a la literatura se requiere de una abstinencia en el consumo de etanol para regresar a niveles basales (Bjarnason, Peters, Wise, 1984). Es recomendable en este tipo de estudios evaluar el efecto del consumo crónico de etanol con respecto a los niveles de LPS en el suero sanguíneo de las ratas como un control positivo de la investigación. De acuerdo a lo reportado en la literatura se esperaría un incremento de LPS en la sangre de las ratas después del tratamiento con el alcohol. También es recomendable verificar la concentración de TNF- α , antes y después del tratamiento con etanol.

De acuerdo a los antecedentes debería registrarse un incremento de su producción por el consumo de etanol crónico. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, el consumo crónico de alcohol en las ratas no afecta los niveles de adiponectina en sangre. Los niveles de adiponectina son importantes ya que entre más alta es su concentración se manifiesta una mejor respuesta a la insulina (Lihn et al 2005). La nula variación de los niveles de adiponectina en el grupo de ratas antes y después de tratarla con el etanol de manera crónica, correlaciona con el mismo efecto que tiene la prueba de sensibilidad a la insulina en los dos grupos de animales control y problema ya que se observó la misma dinámica en la variación de glucosa a través de las tres horas en las que se realizó la prueba de sensibilidad a la insulina. Es probable que sea necesario incrementar la cantidad de alcohol que consumen las ratas para poder observar un efecto. Es posible que el corte de la cola de las ratas provoque en los animales un estrés. El estrés forma parte de una respuesta llamada lucha ó huida, y es estimulada por dos hormonas producidas por la médula suprarrenal, la adrenalina y la noradrenalina, estas hormonas actúan directamente sobre varios tejidos proporcionando al organismo un gran estímulo bioenergético. La adrenalina y la noradrenalina, incrementan la tasa de degradación de glucógeno en el hígado favoreciendo el incremento de la glucosa en la sangre y en los músculos esqueléticos favorecen la liberación de glucosa. Por otra parte en los adipocitos estimulan la liberación de ácidos grasos. Tanto la glucosa como los ácidos grasos liberados entran en circulación sanguínea para ser aprovechados como combustible por el organismo (Sherwin y Saccà 1984). Si bien al cortar la cola de las ratas el estrés puede afectar los niveles de glucosa medidos experimentalmente, del análisis final de los resultados puede obtenerse una conclusión, ya que tanto el grupo control como el grupo problema están sometidos al mismo estrés y el efecto de la adrenalina y la noradrenalina es similar en ambos grupos, de esta manera, si existe alguna diferencia en los niveles de glucosa puede atribuirse solamente al efecto inflamatorio causado por el consumo del alcohol en el grupo tratado con etanol. En las condiciones establecidas para el presente experimento con las ratas, se considera que la concentración de etanol al 14% fue elevada, ya que un animal murió al final del

tratamiento. En la literatura, se encuentran estudios sobre el efectos del consumo de etanol al 30% en este tipo de animales (Sari et al 2006). Sin embargo, mientras más elevada es la concentración de etanol (por encima de una concentración de 14%), menor es el deseo de los animales por beber. Algunos estudios establecieron que seis semanas de tratamiento de esta sustancia puede considerarse como un consumo crónico (Venkatraman et al 2003). Este fue el tiempo que se utilizó en el tratamiento con el etanol.

La adiponectina es una citocina producida por el tejido adiposo, la cual incrementa la sensibilidad a la insulina (Lihn et al 2005), entre más tejido adiposo mayor producción de TNF- α y menor concentración de adiponectina (Kita et al 2005). La adiponectina favorece el incremento en la sensibilidad principalmente en el músculo y tejido adiposo a través de los receptores adipoR1 y adipoR2. En células musculares C2C12, la adición de TNF- α disminuyó la expresión del receptor AdipoR1 produciendo una resistencia a la insulina, al parecer TNF- α induce la unión del factor de transcripción ATF3 a la región promotora del gen que codifica al receptor AdipoR1 regulando negativamente su expresión (Park, Kang, Kim, Jung, 2010).

En células de adipocitos 3T3-L1 la citocina TNF- α disminuye la expresión de adiponectina mediante la inhibición del factor de transcripción C/EBP, el cual es necesario para que el promotor de la adiponectina sea activado en los humanos (Kita et al 2005).

Conclusiones

El consumo crónico de etanol al 14% en ratas no altera las concentraciones de adiponectina ni tampoco altera la sensibilidad a la insulina. Es probable que para observar un efecto sea necesario incrementar la concentración de etanol para lograr un mayor paso de bacterias desde la luz intestinal hacia la sangre de las ratas y con ello favorecer un estado inflamatorio el cual conlleva a la disminución en la concentración sérica de adiponectina y al subsecuente desarrollo de una resistencia a la insulina **1**

Agradecimientos

Agradecemos a Salvador Elisea Quintero quien es responsable del cuidado de los animales en la facultad de Medicina de la Universidad de Colima.

Bibliografía

- Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol*. Vol. 8. 411-420.
- Bentley, R., Meganathan, R. (1982). "Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria". *Microbiol. Rev*. Vol. 46(3). 241-80.
- Bjarnason, I., Peters, T.J., Wise, R.J. (1984). The leaky gut of alcoholism: possible route of entry for toxic compounds. *Lancet*. Vol. 1. 179-182.
- Francis, J.M., Grosskurth, H., Chagalucha, J., Kapiga, S.H., Weiss, H.A. (2014). Systematic review and meta-analysis: prevalence of alcohol use among young people in eastern Africa. *Trop Med Int Health*. Vol. 19(4). 476-488.
- Fu, Y., Luo, N., Klein, R.L., Garvey, W.T. (2005). Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of Lipid Research*. Vol. 46. 1369-1379.
- Fukui, H., Brauner, B., Bode, J.C., Bode, C. (1991). Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. *J Hepatol*. Vol. 12. 162-169.
- Hauge, T., Persson, J., Danielsson, D. (1997). Mucosal bacterial growth in the upper gastrointestinal tract in alcoholics (heavy drinkers). *Digestion*. Vol. 58. 591-595.
- Kelly, D., Conway, S., Aminov, R. (2005). Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol*. Vol. 26. 326-333.
- Keshavarzian, A., Farhadi, A., Forsyth, C.B., Rangan, J., Jakate, S., Shaikh, M., Banan, A., Fields, J.Z. (2009). Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J Hepatol*. Vol. 50. 538-547.
- Kirpich, I.A., Solovieva, N.V., Leikhter, S.N., Shidakova, N.A., Lebedeva, O.V., Sidorov, P.I., Bazhukova, T.A., Soloviev, A.G., Barve, S.S., McClain, C.J., Cave, M. (2008). Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol*. Vol. 42. 675-682.
- Kita, A., Yamasaki, H., Kuwahara, H., Moriuchi, A., Fukushima, K., Kobayashi, M., Fukushima, T., Takahashi, R., Abiru, N., Uotani, S., Kawasaki, E., Eguchi, K. (2005). Identification of the promoter region required for human adiponectin gene transcription: Association with CCAAT/enhancer binding protein-beta and tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 331(2). 484-490.
- Lihn, A.S., Pedersen, S.B., Richelsen, B. (2005). Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev*. Vol. 6(1). 13-21.
- Mai, V., Draganov, P.V. (2009). Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World J Gastroenterol*. Vol. 15. 81-85.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science*. Vol. 296. 301-305.
- McClain, C.J., Barve, S., Deaciuc, I., Kugelmas, M., Hill, D. (1999). Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*. Vol. 19. 205-219.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity". *Nature*. Vol. 388 (6640). 394-397.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. Vol. 454. 428-435.
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., Malik, A.B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. Vol. 20(7). 1126-1167.
- Mutlu, E., Keshavarzian, A., Engen, P., Forsyth, C.B., Sikaroodi, M., Gillevet, P. (2009). Intestinal dysbiosis: a possible mechanism of alcohol-induced endotoxemia and alcoholic steatohepatitis in rats. *Alcohol Clin Exp Res*. Vol. 33. 1836-1846.
- Othman, M., Agüero, R., Lin, H.C. (2008). Alterations in intestinal microbial flora and human disease. *Curr Opin Gastroenterol*. Vol. 24. 11-16.
- Park, H.J., Kang, Y.M., Kim, C.H., Jung, M.H. (2010). ATF3 negatively regulates adiponectin receptor 1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 400(1). 72-77.
- Roman, S., Zepeda-Carrillo, E.A., Moreno-Luna, L.E., Panduro, A. (2013). Alcoholism and liver disease in Mexico: genetic and environmental factors. *World J Gastroenterol*. Vol. 19(44). 7972-7982.

- Sari, Y., Bell, R.L., Zhou, F.C. (2006). Effects of chronic alcohol and repeated deprivations on dopamine D1 and D2 receptor levels in the extended amygdala of inbred alcohol-preferring rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* Vol. 30. 46-56.
- Sherwin, R.S., Saccà, L. (1984). Effect of epinephrine on glucose metabolism in humans: contribution of the liver. *Am J Physiol.* Vol. 247(2). 157-65.
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamosom V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T.R., Libby, P., Weissleder, R., Pittet, M.J. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science.* Vol. 325. 612-616.
- Tan, Y., Kagan, J.C. (2014). A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide. *Mol Cell.* Vol. 54(2). 212-223.
- Van der Bruggen, T., Nijenhuis, S., Van Raaij, E., Verhoef, J., Van Asbeck, B.S. (1999). Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect Immun.* Vol. 67(8). 3824-3829.
- Venkatraman, A., Shiva, S., Davis, A.J., Bailey, S.M., Brookes, P.S., Darley-Usmar, V. M. (2003). Chronic alcohol consumption increases the sensitivity of rat liver mitochondrial respiration to inhibition by nitric oxide. *Hepatology.* Vol. 38. 141-147.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N.H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., Kadowaki, T. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* Vol. 423. 762-769.