



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

Efecto del síndrome metabólico en la expresión
de los receptores a histamina H₃ y dopamina D₁
en el cerebro de la rata

Tesis que presenta

Med. Cir. Adali Miranda Colín

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de
NEUROBIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

Director de proyecto

DR. JOSÉ ANTONIO G. ARIAS MONTAÑO

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Cinvestav del IPN, Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. José Antonio G. Arias Montaña. Se contó con la ayuda experimental del Dr. Juan Escamilla Sánchez y la asistencia técnica de Raúl González Pantoja.

Los tejidos fueron donados por el laboratorio bajo la dirección de la Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega, del Departamento de Bioquímica del Cinvestav-IPN, Unidad Zacatenco. Agradezco a ella y a su equipo de trabajo los recursos y apoyo brindados.

También agradezco a los asesores de este trabajo: Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega, del Departamento de Bioquímica del Cinvestav-IPN, Unidad Zacatenco, por su apoyo y acertadas observaciones a lo largo del avance de este proyecto, y al Dr. Benjamín Florán Garduño, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, del Cinvestav-IPN, Unidad Zacatenco, por todo su apoyo, consejos y observaciones.

Durante el desarrollo del proyecto fui becaria del Conacyt, con el número de beca 935743.

Agradecimientos

Quiero dedicar este trabajo a mi mamá por ser el mayor ejemplo de lucha, fortaleza, independencia y bondad, por ser el pilar de mi vida, por levantarme una y otra vez de las desventuras y principalmente por tu amor incondicional a pesar de la distancia. Me criaste para ser una mujer fuerte e independiente, y a pesar de todas las enseñanzas que me has dado, aún me hace falta aprender mucho de ti, nunca me cansaré de mirarte y sentir orgullo por ti. Gracias por siempre tener tiempo para mí, por celebrar mis logros y, más importante aún, por enseñarme a aprender de mis errores.

A mi padre por ser el hombre más trabajador que conozco, por tu perseverancia, fortaleza, quien ha sacrificado su vida por formarme, educarme y ser una persona de provecho. Gracias por ser mi apoyo incondicional y todo el amor que me has brindado, por cuidar de mí, darme los mejores consejos y enseñarme a ser mejor persona cada día.

Al Dr. Arias por sus enseñanzas y apoyo constante para alcanzar las metas académicas, por permitirme ser parte de su equipo, por enseñarme y por tenerme paciencia, por todas las enseñanzas que me dado. Siempre lo consideraré un gran ejemplo a seguir. Sin usted nada de esto hubiera sido posible.

Quiero agradecer al Dr. Benjamín Floran Garduño y a la Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega, por las valiosas aportaciones que enriquecieron este proyecto, por todas las asesorías a lo largo de este año, por sus revisiones y por

los comentarios que me ayudaron en la exposición del proyecto y en el desarrollo de la tesis. Muchas gracias a ambos.

A Max y Luis, mis compañeros de laboratorio, por todo su apoyo y ayuda con los experimentos. A todos ustedes que me enseñaron una y otra vez, me tuvieron mucha paciencia y por compartir todos sus conocimientos conmigo.

A mis amigas Natalie, Abigail y Nara por ser unas grandes amigas, por enseñarme y apoyarme, por tener siempre tiempo de escuchar mis penas y hacerme reír cuando más lo necesitaba. Por obligarme a ir por un helado cuando más lo necesitaba, y gracias por preocuparse por mí y ayudarme a practicar mis presentaciones. Gracias por ser unas grandes amigas, y esto no sería posible sin su ayuda.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado.

“Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained”

Marie Curie

Contenido

Contenido	IV
Índice de figuras	VI
Abreviaturas	VII
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
1.1. Fisiopatología del Síndrome Metabólico.....	8
1.2. Efectos de la insulina en el SNC.....	13
1.3. Posibles mecanismos lesivos del Síndrome Metabólico en el SNC.....	15
1.3.1. Resistencia a la insulina.....	15
1.3.2. Daño endotelial vascular.....	16
1.3.3. Estrés oxidativo.....	17
1.4. Síndrome Metabólico y receptores acoplados a proteínas G (GPCRS)....	19
1.5. Transmisión histaminérgica.....	20
1.5.1. Receptores a histamina.....	21
1.5.2. Receptor H ₃ (H ₃ R).....	21
1.5.3. Sistema histaminérgico y Síndrome Metabólico	23
1.6. Transmisión dopaminérgica.....	26
1.6.1. Receptores a dopamina.....	26
1.6.2. Receptor D ₁ (D ₁ R).....	27
1.6.3. Dopamina y Síndrome Metabólico.....	28
2. Planteamiento del problema	30
3. Hipótesis	33
4. Objetivo	33
4.1. Objetivos específicos.....	33
5. Metodología	34
5.1. Modelo de Síndrome Metabólico inducido por sacarosa en ratas.....	34

5.2. Determinación de glucosa, triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL en sangre.....	34
5.3. Obtención de membranas de tejidos cerebrales de la rata.....	35
5.4. Ensayo de saturación de la unión de radioligando.....	35
5.5. Ensayos de unión con una concentración de radioligando.....	36
5.6. Análisis estadístico.....	37
6. Resultados.....	38
6.1. Características corporales y parámetros bioquímicos	38
6.2. Determinación de la constante de disociación (Kd) de la [³ H]-NMHA y el [³ H]-SCH 23390 en membranas del neoestriado de ratas naive.....	40
6.3. Expresión del H ₃ R en el neoestriado, la corteza prefrontal e hipocampo de ratas control y experimentales.....	42
6.4. Expresión del D ₁ R en el neoestriado, la corteza prefrontal e hipocampo de ratas control y experimentales.....	42
7. Discusión.....	45
7.1. Modelo de Síndrome Metabólico en ratas macho Wistar.....	45
7.2. Determinación de la constante de disociación (Kd) de la [³ H]-NMHA y el [³ H]-SCH 23390 en membranas del neoestriado de ratas naive.....	49
7.3. Expresión del H ₃ R en el neoestriado, la corteza prefrontal e hipocampo de ratas control y experimentales.....	50
7.4. Expresión del D ₁ R en el neoestriado, la corteza prefrontal e hipocampo de ratas control y experimentales.....	55
7.5. Posibles mecanismos del efecto del Síndrome Metabólico en la función cerebral.....	60
7.5.1. Posible resistencia a la insulina cerebral en ratas con Síndrome Metabólico	60
7.5.2. Obesidad y resistencia a la insulina cerebral en el Síndrome Metabólico	61
8. Conclusión.....	63
9. Perspectivas.....	64
10. Bibliografía.....	65

Índice de Figuras

Figura 1. Fisiopatología del Síndrome Metabólico.....	9
Figura 2. Expresión y distribución del RH ₃ en el cerebro de la rata.....	22
Figura 3. Expresión del RD ₁ en el neostriado de la rata.....	28
Figura 4. Unión saturante de [³ H]-NMHA o [³ H]-SCH 23390 a membranas del neostriado de la rata.....	41
Figura 5. Densidad de H ₃ Rs en membranas de la corteza prefrontal, el neostriado y el hipocampo de ratas control y con Síndrome Metabólico.....	43
Figura 6. Densidad de D ₁ Rs en membranas de la corteza prefrontal, el neostriado y el hipocampo de ratas control y con Síndrome Metabólico	44
Tabla 1. Comparación de las características corporales y parámetros bioquímicos de ratas control y con Síndrome Metabólico.....	39

Abreviaturas

AHA	<i>American Heart Association</i>
AMPA	Ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina
BG4KO	<i>Knockout</i> del transportador de glucosa 4 (GLUT-4)
BHE	Barrera hemato-encefálica
D ₁ R	Receptor a dopamina D ₁
DIO	Obesidad inducida por la dieta
DM	Diabetes Mellitus
DM1	DM tipo 1
DM2	DM tipo 2
ECVs	Enfermedades cardiovasculares
FFAR1	Receptor 1 de ácidos grasos libres
FID	Federación Internacional de Diabetes
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GIP	Receptor del polipéptido insulínico
GIPR	Receptor a incretina
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₃ R	Receptor a histamina H ₃
HA	Histamina
HDC	Descarboxilasa de L-histidina
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HFD	Dieta alta en grasa
IAS	<i>International Atherosclerosis Society</i>
IASO	<i>International Association for the Study of Obesity</i>
IL-6	Interleucina 6
IRS	Sustrato del receptor a insulina
LTD	Depresión a largo plazo

LTP	Potenciación a largo plazo
MAPKs	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos (<i>Mitogen-activated protein kinases</i>)
MCP-1	Proteína quimio-atrayente de monocitos tipo 1
NHLBI	<i>National Heart Lung and Blood Institute</i>
NIRKO	<i>Knockout</i> del receptor a insulina neuronal
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH ⁻	Radical hidroxilo
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno
PCR	Proteína C reactiva
PI3K	3-Cinasa de fosfatidilinositol
RI	Resistencia a la insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
-SH	Grupo sulfhidrilo
SN	Sustancia negra
SNC	Sistema Nervioso Central
SNc	Sustancia negra parte compacta
Sx Met	Síndrome Metabólico
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VMAT-2	Transportador vesicular de monoaminas tipo 2
VTA	Área tegmental ventral
WHF	<i>World Heart Federation</i>

Resumen

El Síndrome Metabólico (Sx Met) es un estado pre-diabético que comprende una serie de características bioquímicas y fisiopatológicas: obesidad, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia, concentración baja de lipoproteínas de alta densidad (HDL), hipercolesterolemia y resistencia a la insulina. La prevalencia del Sx Met en adultos de la Ciudad de México es de 59.7-68.7%.

La superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, *G protein-coupled receptors*) está conformada por proteínas receptoras involucradas en la detección de una amplia gama de sustancias, como hormonas, neurotransmisores, odorantes y saborizantes. Los posibles mecanismos lesivos del Sx Met en el Sistema Nervioso Central incluyen la resistencia a la insulina, el daño endotelial vascular y el estrés oxidativo. Sin embargo, existe poca información en relación al efecto del Sx Met en la función de los GPCRs.

La histamina regula funciones como el ciclo vigilia/sueño, la ingesta de agua y alimentos, la temperatura corporal, la analgesia y la actividad motora, entre otras. El receptor a histamina H₃ activa proteínas G_{αi/o} y se distribuye en todo el SNC, particularmente en el hipotálamo, la corteza cerebral, el neocórtex, el núcleo accumbens y el hipocampo. Su localización es post-y pre-sináptica, como autorreceptor y heterorreceptor.

La dopamina participa en diversas funciones cerebrales como la recompensa, el movimiento voluntario, el estado de ánimo, la atención, la motivación, el sueño, la memoria de trabajo y el aprendizaje. El receptor a dopamina D₁, acoplado a proteínas G_{αs}, es el receptor más abundante en el SNC. Se encuentra en alta densidad en el neocórtex, núcleo accumbens, hipotálamo, sustancia negra reticulada, tubérculo olfatorio, corteza frontal y temporal e hipocampo.

El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de los receptores H₃ y D₁ en la corteza prefrontal, neocórtex e hipocampo en un modelo experimental de Sx

Met en la rata, inducido por la ingestión de sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 16 semanas.

Las ratas del grupo experimental presentaron un aumento significativo en el peso corporal, dislipidemia y obesidad abdominal. Mediante ensayos de unión de radioligando (H₃R, [³H]-NMHA; D₁R, [³H]-SCH 23390) se determinó una disminución en la expresión de ambos receptores en el neocórtex, y no así en la corteza prefrontal y el hipocampo. Para el H₃R la densidad de receptores disminuyó de 73.7 ± 4.4 a 55.2 ± 6.2 fmol/mg de proteína, y para el D₁R la disminución fue de 171.8 ± 14.1 a 95.3 ± 9.7 fmol/mg de proteína.

En conclusión, las ratas con consumo de sacarosa presentan características del Sx Met, así como disminución en la densidad de receptores a dopamina D₁ y a histamina H₃ en el neocórtex. Este último efecto podría deberse a lesión neuronal previa a aparición de Diabetes Mellitus.

Abstract

The Metabolic Syndrome (Sx Met) is a pre-diabetic state that comprises a series of biochemical and pathophysiological characteristics, namely obesity, high blood pressure, hypertriglyceridemia, low concentration of high-density lipoproteins (HDL), hypercholesterolemia, and insulin resistance. The prevalence of Sx Met in Mexico City adults is 59.7-68.7%.

The superfamily of G protein-coupled receptors (GPCRs) is formed by receptors involved in the detection of a wide range of substances, such as hormones, neurotransmitters, odorants and flavorings. The damaging mechanisms of Sx Met in the Central Nervous System (CNS) include insulin resistance, vascular endothelial damage and oxidative stress. However, information on the effect of Sx Met on GPCR function is still scarce.

In the CNS, histamine regulates functions such as the wake/sleep cycle, food and water intake, body temperature, analgesia and motor activity, among others. The histamine H₃ receptor (H₃R) activates G $\alpha_{i/o}$ proteins, and is distributed throughout the CNS, particularly in the hypothalamus, cerebral cortex, striatum, nucleus accumbens, and hippocampus. The receptor is found post- and pre-synaptically, as autoreceptor and heteroreceptor.

The dopaminergic system participates in various brain functions such as reward, voluntary movement, mood, attention, motivation, sleep, working memory and learning. The dopamine D₁ receptor (D₁R), coupled to G α_s proteins, is the most abundant GPCR in the CNS, with high density in the striatum, nucleus accumbens, hypothalamus, substantia nigra reticulata, olfactory tubercle, frontal and temporal cortex, and hippocampus.

In this work, we aimed to determine H₃R and D₁R expression in the prefrontal cortex, striatum and hippocampus in an experimental animal model of Sx Met, in which Wistar rats received 30% sucrose in the drinking water for 16 weeks.

Sx Met rats showed increased body weight, dyslipidemia, and developed abdominal obesity. Radioligand binding assays (H₃R, [³H]-NMHA; D₁R, [³H]-SCH 23390) showed a significant reduction in H₃R and D₁R density in the striatum, but not in prefrontal cortex or hippocampus. For the H₃R, density decreased from 73.7 ± 4.4 to 55.2 ± 6.2 fmol/mg protein, whereas D₁R density decreased from 171.8 ± 14.1 to 95.3 ± 9.7 fmol/mg protein.

In conclusion, rats with sucrose consumption developed Sx Met characteristics, and showed decreased density of both dopamine D₁ and histamine H₃ receptors in the striatum. The latter effect could be underlain by neuronal lesion before Diabetes Mellitus appearance.

1. Introducción

El Síndrome Metabólico (Sx Met) describe un grupo de alteraciones que incluyen obesidad, dislipidemia, hipertensión y resistencia a la insulina. El descubrimiento del Sx Met se remonta al siglo XX, cuando Kylin (1923) describió una combinación de trastornos metabólicos (hipertensión arterial, hiperglucemia y gota). En la década de los 1940s, Vague (1947) indicó la asociación entre la adiposidad de la parte superior del cuerpo, la hipertensión y la diabetes, lo que condujo a Haller y Hanefeld (1975) a acuñar el término Sx Met, definiéndolo como una combinación de factores de riesgo concurrentes para Diabetes Mellitus (DM) y enfermedades cardiovasculares (ECVs). Otros términos surgieron en años posteriores, como Síndrome X (Reaven, 1988) y Síndrome de Resistencia a la Insulina (Haffner et al., 1992).

El Sx Met comprende una serie de características bioquímicas y fisiopatológicas: obesidad, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia, disminución de la concentración plasmática de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), hipercolesterolemia y resistencia a la insulina. Si bien todavía existe discusión sobre los criterios diagnósticos (Martins et al., 2019), durante la última década varios esquemas han sido propuestos por diferentes organizaciones. como la Federación Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation*, IDF), la Asociación Norteamericana del Corazón (*American Heart Association*, AHA) y el Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre (*National Heart Lung and Blood Institute*, NHLBI) de los Estados Unidos de América (EUA).

La principal diferencia entre los criterios refiere a la obesidad central, siendo este un componente obligatorio en la definición de la IDF (Alberti et al., 2005), y un criterio de menor relevancia y específico de la etnia para la AHA y el NIHLB (Alberti et al., 2009).

En el año 2009, en una reunión para la unificación de criterios que incluyó a varias organizaciones, específicamente IDF, AHA, NIHLB, la Federación Mundial del Corazón (*World Heart Federation, WHF*), la Sociedad Internacional de Ateroesclerosis (*International Atherosclerosis Society, IAS*), y la Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad (*International Association for the Study of Obesity, IASO*), se establecieron los criterios armonizados para el diagnóstico de Sx Met. Se acordó que no deberían existir componentes obligatorios, sino que el diagnóstico se basaría en la presencia de tres de los cinco criterios siguientes (Alberti et al., 2009):

- Obesidad central (de acuerdo con los valores específicos de la etnia)
- Triglicéridos elevados (> 150 mg/dL)
- Colesterol HDL reducido (< 40 mg/dL en hombres, y < 50 mg/dL en mujeres)
- Presión arterial elevada (sistólica > 130 o diastólica > 85 mm Hg)
- Glucosa plasmática en ayuno elevada (> 100 mg/dL)

La prevalencia del Sx Met está determinada por varios factores; principalmente por los criterios diagnósticos adoptados, seguidos por la edad y el origen étnico (Ahima, 2016), y está inversamente relacionada con el nivel educativo, el estilo de vida (dieta alta en grasas y falta de ejercicio) y el estado socio-económico. Se ha propuesto a la rápida urbanización como un factor principal para la creciente incidencia del Sx Met (Ahima, 2016), y se considera que uno de cada cinco adultos en los EUA cumple los criterios diagnósticos (Falkner et al., 2014). La prevalencia del Sx Met a nivel mundial en la población adulta es de 20-25% (Alberti et al., 2006), y además de los factores mencionados, los antecedentes genéticos, familiares de DM y el tabaquismo son factores de riesgo adicionales (Cameron et al., 2004).

Además de ser considerado un estado pre-diabético, el Sx Met es un factor de riesgo crítico para las ECVs, una de las principales causas de muerte en México, y los mecanismos moleculares subyacentes podrían estar relacionados con el desarrollo de un estado circulatorio hiperdinámico que desencadenaría alteraciones cardíacas y hemodinámicas (Dincer, 2012).

La Encuesta Nacional de Salud de 2018 (ENSANUT) indica que el porcentaje de la población mexicana ≥ 20 años con Diabetes o hipertensión arterial es 10.3% (~8.6 millones de personas) y 18.4% (~15.2 millones de personas), respectivamente. Los valores de colesterol y triglicéridos estuvieron elevados en el 19.5% de la misma población, y el porcentaje de individuos con sobrepeso y

obesidad de acuerdo a la edad fue: ≥ 20 años, 39.1% y 36.1%; 0-4 años, 8.2% (sobrepeso); 5-11 años, 18.1% y 17.5%; 12-19 años: 23.8% y 14.6%.

Arellano-Campos et al. (2019) reportaron una alta prevalencia de alteraciones relacionadas con el Sx Met en la población mexicana; por ejemplo, obesidad abdominal en el 78.1% de la muestra poblacional, con prevalencia de DM incidente asociada al síndrome de 43.9%, y prevalencia del Sx Met en adultos de la Ciudad de México de 59.7-68.7%. Si bien la prevalencia del Sx Met depende de los criterios diagnósticos utilizados y de las características (sexo, edad, raza y etnia) de la población estudiada (Eckel et al., 2010), su prevalencia es alta y está aumentando en todas las sociedades occidentales, probablemente como resultado de la epidemia de obesidad (Hollman et al., 2008).

1.1. Fisiopatología del Síndrome Metabólico

Un factor temprano contribuyente al desarrollo de la resistencia a la insulina es el exceso de ácidos grasos circulantes. Los ácidos grasos unidos a la albúmina plasmática provienen principalmente de las reservas de triglicéridos del tejido adiposo, y son liberados por enzimas lipolíticas intracelulares (ver Figura 1). Los ácidos grasos también provienen de la lipólisis de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en los tejidos por efecto de las enzimas lipasa hormono-sensible y lipasa de triglicéridos (Langin, 2005). La insulina media la anti-lipólisis y estimula a la lipasa de lipoproteínas en el tejido adiposo. Por tanto, cuando se desarrolla la resistencia a la insulina, el aumento en la lipólisis genera más ácidos grasos, lo que reduce aún más el efecto anti-lipolítico de la insulina. Por otro lado, los ácidos

grasos libres implican un exceso de sustrato para los tejidos sensibles a la insulina y provocan alteraciones del sistema de señales que regulan el metabolismo de la glucosa (Laclaustra et al., 2007).

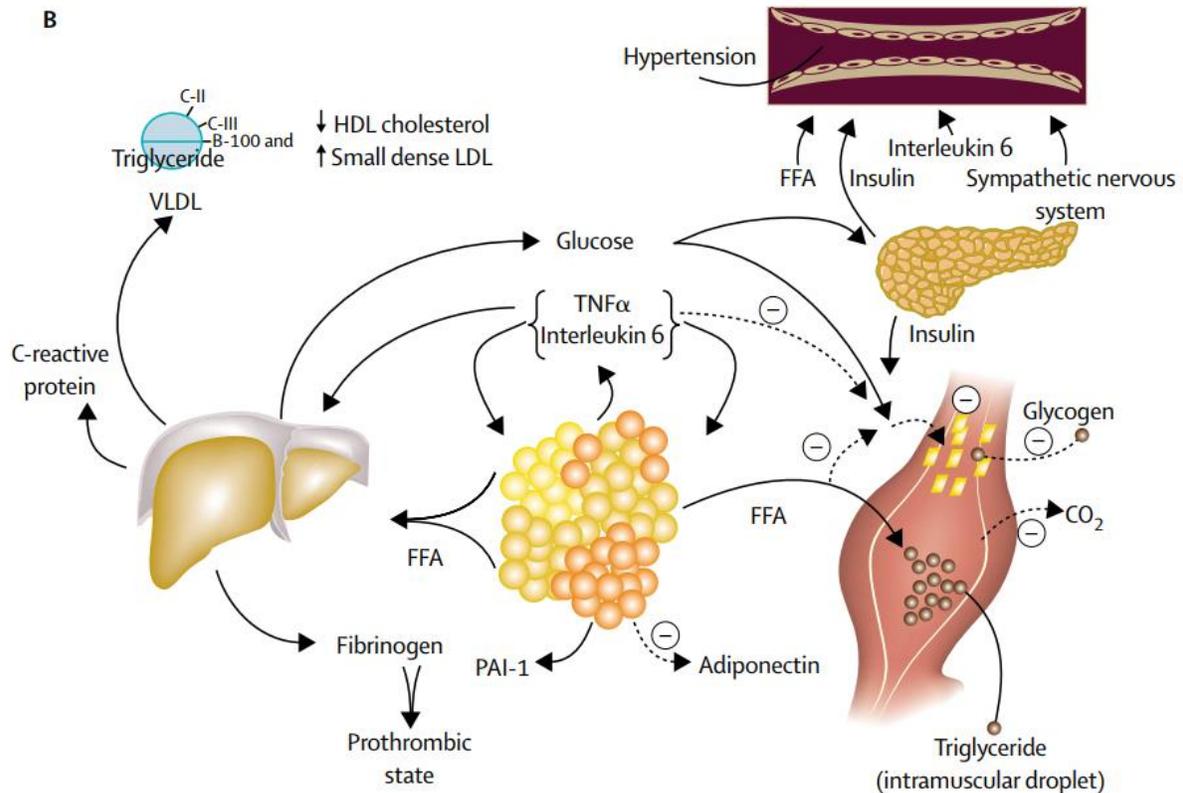


Figura 1. Fisiopatología del Síndrome Metabólico. Los ácidos grasos libres (FFA, *free fatty acids*) se liberan en abundancia por el aumento del tejido adiposo. En el hígado, los FFA inducen una mayor producción de glucosa y de triglicéridos, así como de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (*very-low density lipoproteins*, VLDL). Las alteraciones de lípidos/lipoproteínas incluyen disminución de HDL y aumento de lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoproteins*, LDL). Los FFA también reducen la sensibilidad a la insulina en el músculo y disminuyen la absorción de glucosa, lo que conduce a disminución de la síntesis de glucógeno a partir de glucosa y mayor acumulación de lípidos. La glucosa circulante elevada y, en cierta medida los FFA, aumentan la secreción pancreática de insulina, lo que resulta en hiperinsulinemia, que a su vez aumenta la

reabsorción renal de sodio y la actividad del sistema nervioso simpático, y puede contribuir por lo tanto a hipertensión arterial, a la par de los niveles elevados de FFA. Contribuyendo a la resistencia a la insulina se encuentran los efectos paracrino y endocrino del estado pro-inflamatorio, producido por diversas células presentes en el tejido adiposo, como los adipocitos y los macrófagos derivados de monocitos. Además, un aumento en la liberación de interleucina 6 (IL-6) y del factor de necrosis tumoral α (TNF α) origina mayor resistencia a la insulina y lipólisis de las reservas de triglicéridos del tejido adiposo, lo que resulta en un aumento de FFA circulantes. La IL-6 y otras citocinas aumentan en la circulación, incrementando la producción de glucosa y de VLDL hepáticas, lo que incrementa la resistencia a la insulina en el músculo. Las citocinas y los FFA también aumentan la producción de fibrinógeno y PAI-1 por el hígado, complementando la sobre-producción de plasminógeno-1 (PAI-1) por el tejido adiposo, lo que resulta en un estado pro-trombótico. La disminución de la producción de la citocina adiponectina, anti-inflamatoria y sensibilizante a la insulina, también se asocia con el Síndrome Metabólico y la resistencia a la insulina. Superpuesto a lo anterior, y contribuyente a la resistencia a la insulina producida por el exceso de FFA, se encuentra los efectos paracrino y endocrino del estado pro-inflamatorio. La mayor liberación de IL-6 y TNF α , entre otras citocinas, por una variedad de células en el tejido adiposo, incluidos los adipocitos y los macrófagos derivados de monocitos, conduce a mayor resistencia a la insulina y lipólisis del tejido adiposo. Además, los triglicéridos se almacenan en los FFA circulantes. La IL-6 y otras citocinas también aumentan en la circulación, y pueden aumentar la producción de glucosa y de VLDL por el hígado y la resistencia a la insulina en el músculo. Por otra parte, las citocinas y los FFA aumentan la producción hepática de fibrinógeno y del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), lo que conduce a la sobreproducción de PAI-1 por el tejido adiposo, y origina un estado pro-trombótico. La disminución de la producción de la adiponectina, una citocina anti-inflamatoria y sensibilizante a la insulina, también está asociada con el Síndrome Metabólico y puede contribuir a su fisiopatología. Tomado de Eckel et al. (2005).

Los ácidos grasos afectan la captación de la glucosa inducida por la insulina y se acumulan como triglicéridos en el músculo esquelético y cardíaco, mientras que en el hígado aumenta la producción de glucosa y se acumulan triglicéridos. Con el aumento del tejido adiposo visceral, los ácidos grasos derivados de los adipocitos

se dirigen al hígado. Este flujo se relaciona con un aumento en la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que contienen apolipoproteína B (ApoB) y son ricas en triglicéridos (Avramoglu et al., 2006).

Otro trastorno relevante de las lipoproteínas en el Sx Met es la reducción en el colesterol HDL, consecuencia de los cambios en la composición y metabolismo de las HDL. En presencia de hipertrigliceridemia, la disminución del contenido de colesterol HDL se debe al menor contenido de éster de colesterilo en el centro de la lipoproteína, combinado con alteraciones en la transferencia de éster de colesterilo, mediada por la proteína de transferencia de éster de colesterol que hacen que esta partícula sea pequeña y densa. Este cambio en la composición de la lipoproteína también aumenta la eliminación de HDL de la circulación (Ginsberg, 2000).

Los defectos en la acción de la insulina en el Sx Met alteran la supresión de la producción de glucosa en el hígado y los riñones, y disminuyen la captación y el metabolismo de la glucosa en los tejidos sensibles a la insulina (músculo y tejido adiposo). Para compensar las alteraciones en la acción de la insulina y mantener la normoglucemia, deben modificarse la secreción y eliminación de la insulina. En condiciones fisiológicas, la insulina es un vasodilatador con efectos secundarios en la reabsorción de sodio en los riñones. Sin embargo, en la resistencia a la insulina el efecto vasodilatador de la hormona se pierde, pero el efecto renal en la reabsorción de sodio se conserva. La insulina también aumenta la actividad del

sistema nervioso simpático, un efecto que puede conservarse en la resistencia a la insulina (Egan, 2003).

La resistencia a la insulina se caracteriza por daño en la vía específica de señalización de la 3-cinasa de fosfatidilinositol (PI3K por sus siglas en inglés, *phosphatidylinositol 3-kinase*). En el endotelio, esta alteración puede originar un desbalance entre la producción de óxido nítrico y la secreción de endotelina 1, con un descenso consecuente en el flujo sanguíneo (Figura 1). Otro posible mecanismo subyacente a la hipertensión en el Sx Met es la alteración de la actividad vasoactiva del tejido adiposo perivascular. Además, se ha reportado que en las arterias cerebrales y renales las especies reactivas de oxígeno (ROS) liberadas por la NADPH oxidasa afectan la función endotelial y causan vasoconstricción local (Brandes et al., 2010).

Es posible que otros efectos paracrinos estén mediados por la leptina u otras citocinas pro-inflamatorias liberadas del tejido adiposo, como el $\text{TNF}\alpha$. El aumento en las citocinas pro-inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, interleucinas 1, 6 y 18, y resistina, entre otras) refleja una síntesis excesiva en la masa adiposa aumentada. Es probable que los macrófagos derivados del tejido adiposo sean la fuente principal tanto de las citocinas pro-inflamatorias locales como de las presentes en la circulación sistémica (Rieusset et al., 2004).

La adiponectina es una citocina anti-inflamatoria producida sólo por los adipocitos, que intensifica la sensibilidad a la insulina e inhibe diversas etapas del proceso inflamatorio. En el hígado, la adiponectina inhibe la expresión de las enzimas

gluconeogénicas y el ritmo de producción de glucosa. En el músculo, aumenta el transporte de glucosa e intensifica la oxidación de ácidos grasos, efecto debido en parte a la activación de la cinasa dependiente de AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*). De manera relevante, la concentración de adiponectina se reduce en el Sx Met (Xu et al., 2003).

1.2. Efectos de la insulina en el SNC

La insulina es una hormona peptídica anabólica, con una función crucial en la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo humano. Promueve la absorción de glucosa sanguínea y la glucogénesis, e inhibe la gluconeogénesis y la glucogenólisis (Dodd et al., 2017). La mayoría de los receptores a insulina se encuentran en los tejidos periféricos (principalmente en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo). Sin embargo, se ha reportado una alta densidad en el cerebro, principalmente en las áreas responsables de la regulación de las funciones cognitivas y el apetito (Maciejczyk et al., 2019).

Independientemente del sitio de acción de la insulina, esta hormona ejerce un mecanismo molecular similar en el cerebro y en los tejidos periféricos (Banks et al., 2012; Kleinridders et al., 2014). En el cerebro las acciones de la insulina incluyen la regulación de la ingesta de alimentos, de las conductas de alimentación, del peso corporal y de la homeostasis energética (Maciejczyk et al., 2019). Estos efectos pueden deberse a dos componentes principales de los sistemas de transducción de la insulina cerebral: la vía PI3K/ Akt y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*,

MAPKs)/proteína Ras (Blázquez et al., 2014). Sin embargo, algunas de las acciones de insulina son específicas para el SNC. De hecho, la insulina tiene varias funciones neuronales: protege a las neuronas de efectos tóxicos, participa en la plasticidad sináptica y regula funciones cerebrales como la memoria, la cognición, el aprendizaje y la atención (Stockhorst et al., 2004; Banks et al., 2012; Gray et al., 2014;).

La insulina puede modular la actividad neuronal mediante diversos mecanismos moleculares (Feldman et al., 2009; Blázquez et al., 2014; Gray et al., 2014). Por ejemplo, modifica la densidad de receptores a neurotransmisores, inhibe la recaptura de noradrenalina en neuronas disociadas de la rata (Raizada et al., 1988), y aumenta la recaptura de serotonina (Blázquez et al., 2014; Zhao et al., 2001). También modula la potenciación a largo plazo (*Long-term potentiation*, LTP) y la depresión a largo plazo (*Long-term depression*, LTD) al reducir la cantidad de receptores a glutamato ionotrópicos AMPA (ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), así como al estimular la translocación de los receptores al ácido γ -aminobutírico (GABA) en la membrana post-sináptica (Song et al., 2002; Feldman et al., 2009; Blázquez et al., 2014).

Se ha postulado que la insulina también participa en el metabolismo neuronal de la glucosa, y el transportador de glucosa regulado por insulina (GLUT-4) ha sido identificado en el cerebro (Vannucci et al., 1998). En estudios recientes, los ratones NIRKO (*knockout* del receptor de insulina neuronal) mostraron alteraciones en las neuronas hipotalámicas que sensan la concentración de

glucosa en respuesta a hipoglucemia (Diggs-Andrews et al., 2010), y estudios con ratones *knockout* selectivos del GLUT-4 cerebral (BG4KO) indican un papel importante del GLUT-4 en la regulación del nivel de glucosa sistémica (Reno et al., 2017). Además, la insulina cerebral también determina diversos efectos metabólicos por modulación de las fibras eferentes vagales y simpáticas (Scherer et al., 2011). Estas acciones incluyen la supresión de la producción hepática de glucosa, la secreción hepática de triglicéridos, y la lipólisis en el tejido adiposo (Maciejczyk et al., 2019).

1.3. Posibles mecanismos lesivos del Síndrome Metabólico en el SNC

1.3.1. Resistencia a la insulina

La insulina desempeña una función importante en el procesamiento de la memoria en el hipocampo, mediante la activación de receptores específicos. Por lo tanto, la resistencia a la insulina en el hipocampo podría afectar el aprendizaje espacial y la plasticidad sináptica (Grillo et al., 2015). Además, la señalización iniciada por la insulina en el SNC participa de manera importante en la regulación de la ingesta de alimento, el peso corporal y la reproducción (Arshad et al., 2018).

Un estudio en ratones con alteración específica de los receptores a insulina cerebrales mostró que la resistencia a la hormona en el cerebro induce un comportamiento tipo depresivo y ansiedad. Este estudio también concluyó que la resistencia a la insulina en el cerebro puede alterar la función mitocondrial,

aumentar las oxidasas de monoaminas y el transporte de la dopamina del espacio extracelular (Kleinridders et al., 2015).

Normalmente la insulina aumenta la vasodilatación inducida por el óxido nítrico (NO) y regula la vasoconstricción debida a la endotelina-1. Así, la resistencia a la insulina disminuye la síntesis de NO y aumenta la actividad de la endotelina 1, favoreciendo la vasoconstricción y reduciendo las funciones capilares. Como resultado, la disfunción endotelial reduce el transporte de insulina, y posteriormente disminuye la función capilar y el flujo sanguíneo microvascular. Esta condición exagera las anormalidades de los lípidos y la glucosa, creando un circuito de retroalimentación negativa entre la disfunción endotelial progresiva y la resistencia a la insulina. La vasoconstricción y la disminución de las funciones capilares pueden alterar la integridad y función de la unidad neurovascular, reduciendo las interacciones entre las neuronas, el endotelio y los astrocitos (Arshad et al., 2018).

1.3.2. Daño endotelial vascular

El endotelio participa en la regulación del tono vascular, el flujo sanguíneo de los tejidos, las respuestas inflamatorias y el mantenimiento de la fluidez sanguínea. Varios estudios han mostrado que cada componente del Sx Met contribuye independientemente a la disfunción endotelial (Arshad et al., 2018).

Los pacientes con Sx Met mostraron deterioro en la función endotelial en los lechos micro y macrocirculatorios (Walther et al., 2015), y aquellos con Sx Met y DM mostraron disfunción endotelial exacerbada caracterizada por reducción de la

vasorrelajación mediada por el endotelio, desregulación hemodinámica, alteración de la capacidad fibrinolítica, aumento de la expresión de moléculas de adhesión y genes inflamatorios, generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumento del estrés oxidativo y aumento de la permeabilidad celular (Hirose et al., 2010). La activación de estos ciclos perniciosos altera la función endotelial, aumenta la vasoconstricción y la inflamación, y promueve la trombosis. La agrupación de factores de riesgo como colesterol LDL elevado, colesterol HDL disminuido, triglicéridos elevados, presión arterial elevada e hiperglucemia en el Sx Met contribuye directamente al daño endotelial (Sena et al., 2013).

1.3.3. *Estrés oxidativo*

Todos los organismos aeróbicos experimentan estrés oxidativo debido a que las ROS se derivan del metabolismo del oxígeno (Floyd, et al., 2002).

El cerebro es particularmente vulnerable al estrés oxidativo debido a que: 1) tiene un alto contenido de ácidos grasos insaturados fácilmente peroxidables; 2) requiere altas concentraciones de oxígeno por unidad de peso; 3) no está enriquecido con enzimas antioxidantes; 4) es un tejido altamente vascularizado y metabólicamente activo, rico en lípidos y por lo tanto muestra mayor probabilidad de experimentar un rápido aumento del daño oxidativo (Floyd et al., 2002). Además, las neuronas son particularmente vulnerables a los cambios oxidativos acumulativos al ser células que no se dividen o ser células permanentes que sobreviven durante décadas. El estrés oxidativo se caracteriza por niveles excesivos de ROS, como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno

(H₂O₂) y el radical hidroxilo (OH⁻), y se ha involucrado en lesión neuronal y apoptosis celular asociadas con enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Luque-Contreras et al., 2014). El Sx Met ha sido considerado un estado de estrés oxidativo, propuesto como mecanismo crucial de la glucotoxicidad, estimulando tanto la resistencia a la insulina celular como el daño a las células pancreáticas β.

En el modelo de diabetes inducido por aloxano, este fármaco es absorbido por su similitud estructural con la glucosa y es capturado de manera altamente eficiente por las células pancreáticas β, en las que induce oxidación de grupos sulfhidrilo (-SH), inhibición de la enzima glucocinasa, generación de radicales libres y alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular (Rohilla, et al., 2012). En el cerebro de estas ratas experimentales se observó aumento de la producción de ROS y NO, y de la peroxidación de lípidos, y los animales presentaron un comportamiento tipo depresivo, efectos que se revirtieron con un tratamiento antioxidante (Réus et al., 2016). En el sistema nervioso, las mitocondrias desempeñan una función crítica en la transmisión sináptica, que requiere energía, y en la homeostasis del calcio. El Sx Met se ha relacionado con disfunción mitocondrial y disminución de la producción de ATP, y el desequilibrio entre la producción y el consumo de energía puede conducir a daño en el metabolismo celular que se considera como uno de los principales causantes del Sx Met (Arshad et al., 2018).

El consumo de una dieta alta en grasa (HFD) indujo alteraciones significativas en el rendimiento cognitivo y una mayor expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF α e IL-6, y de quimocinas como la proteína quimo-atrayente de monocitos 1 (MCP-1), así como un aumento de la astrogliosis y la microgliosis. Es ampliamente conocido que las células inmunes activas producen grandes cantidades de ROS, y que las citocinas pro-inflamatorias promueven la producción de ROS en varios tipos de células, incluidas las neuronas. Por lo tanto, la inflamación y el estrés oxidativo están estrechamente relacionados entre sí, y generalmente co-existen y pueden regular la remodelación sináptica y la función neuronal mediante diversos mecanismos (Arshad et al., 2018).

1.4. Síndrome Metabólico y receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

La superfamilia de GPCRs está conformada por proteínas receptoras involucradas en la detección de una amplia gama de sustancias, como hormonas, neurotransmisores, odorantes y saborizantes (Psichas et al., 2017). Los dominios especializados de unión a ligando permiten que cada receptor responda a un estrecho rango de estructuras químicas, lo que genera sitios selectivos para la unión de fármacos.

Existe poca información en relación al efecto del Sx Met en la función de los GPCRs. Por ejemplo, para el sistema endocrino las nuevas terapias farmacológicas dirigidas a GPCRs se basan en la especificidad celular de la expresión de los receptores para la activación de un rango selecto de tejidos blanco, como las células pancreáticas β , las células endocrinas intestinales y las

neuronas involucradas en el control del apetito (Mancini et al., 2015). En otro ejemplo, el receptor GLP-1 es blanco de fármacos dirigidos a los tejidos de relevancia para la DM tipo 2 (DM2) y la obesidad, y se realizan estudios clínicos de ligandos del receptor 1 de ácidos grasos libres (FFAR1 ó GPR40), GPR119 y del receptor del polipéptido insulínico (GIP) dependiente de glucosa. En la terapéutica de la DM2 se evalúan también otros GPCRs que incluyen los receptores a incretina (GIPR) y a FFAR4 (GPR120), y el receptor a ácidos biliares GPBAR1 (TGR5) (Reimann et al., 2016).

1.5. Transmisión histaminérgica

La histamina es un modulador en el SNC de los mamíferos, donde regula funciones como el ciclo vigilia/sueño, la ingesta de agua y alimentos, la temperatura corporal, la analgesia y la actividad motora, entre otras (Schwartz et al., 1991; Hill et al., 1997). Las neuronas histaminérgicas se localizan en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo (TMN; Wada et al., 1991), con ~4,500 y 64,000 neuronas en el TMN de la rata y el humano, respectivamente (Nieto-Alamilla et al., 2016).

La histamina se genera a partir del amino ácido L-histidina, y su síntesis involucra el transporte de la L-histidina al interior de la célula y la acción de la descarboxilasa de histidina (HDC), dependiendo por lo tanto de la actividad de la enzima y de la disponibilidad del sustrato (Schwartz et al., 1972, 1991). El transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT-2) almacena a la histamina en las vesículas de las varicosidades axónicas (Merickel y Edwards, 1995), y su

liberación ocurre por exocitosis (Verdiere et al., 1975; Van der Werf et al., 1987). La síntesis y la liberación de la amina se regulan por autorreceptores H_3 (Arrang et al., 1983) y por heterorreceptores muscarínicos M_1 (Reinheimer et al., 1997; Reinheimer et al., 2000), adrenoceptores α_2 (Gulat-Marnay et al., 1989) y $GABA_B$ (Okakura-Mochizuki et al., 1996).

1.5.1. Receptores a histamina

En el SNC la histamina ejerce sus efectos activando tres (H_1R , H_2R y H_3R) de los cuatro receptores descritos a la fecha (H_1R - H_4R), que pertenecen a la clase A de la superfamilia de GPCRs (Panula et al., 2015). Los receptores H_1 se acoplan preferentemente a proteínas $G\alpha_{q/11}$ y por lo tanto inducen la movilización de Ca^{2+} de depósitos intracelulares, mientras que los receptores H_2 estimulan la formación de AMP cíclico (AMPC) mediante proteínas $G\alpha_s$ (Hill, 1990; Hill et al., 1997). Los receptores H_3 se acoplan a proteínas $G\alpha_{i/o}$ y su activación tiene como efectos principales la inhibición de canales Ca^{2+} activados por voltaje de los tipos N y P/Q, y la reducción de la formación de AMPC (Hill et al., 1997; Lovenberg et al., 1999; Nieto-Alamilla et al., 2016).

1.5.2. Receptor H_3 (H_3R)

Se distribuye en todo el SNC, particularmente en el hipotálamo, la corteza cerebral, el neocórtex, el núcleo accumbens y el hipocampo (Figura 2). Su localización es post-y pre-sináptica, con predominio de esta última. Como autorreceptor pre-sináptico inhibe la síntesis y la liberación de la propia histamina, y como autorreceptor somatodendrítico reduce la excitabilidad de las neuronas

histaminérgicas. Como heterorreceptor presináptico inhibe la liberación de glutamato, GABA, noradrenalina, serotonina, dopamina y acetilcolina (Nieto-Alamilla et al., 2016; Schlicker et al., 2017).

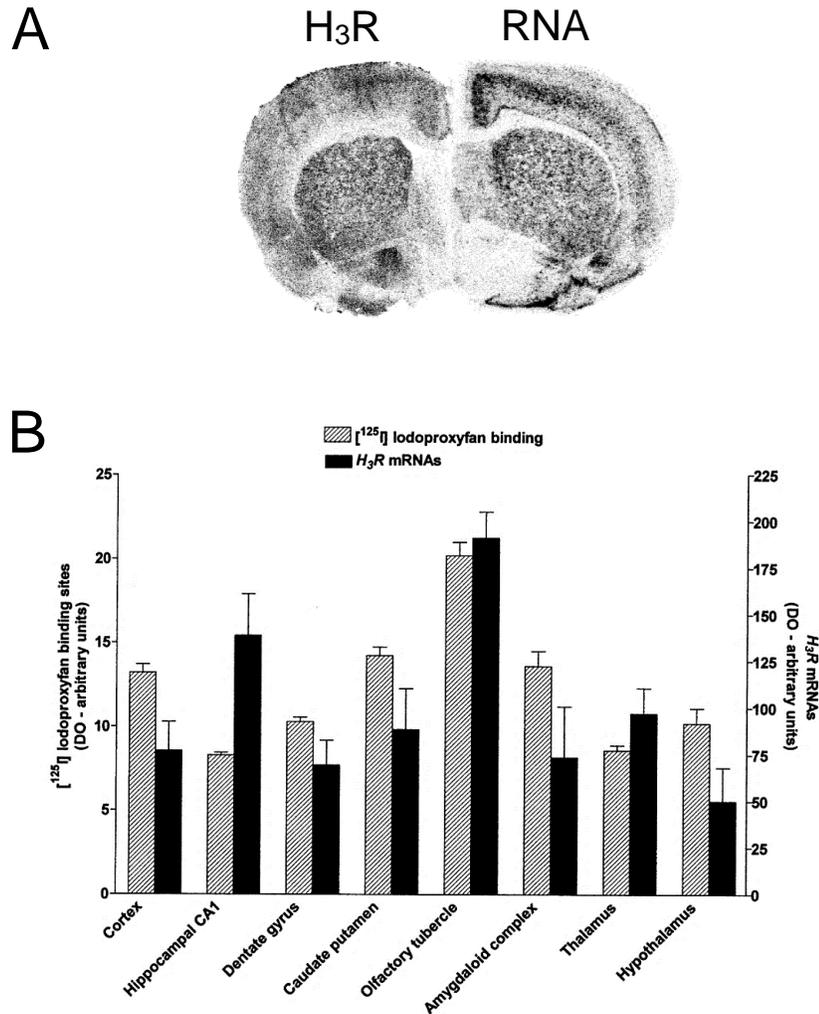


Figura 2. Expresión y distribución del RH₃ en el cerebro de la rata.

A) Autorradiografías en un corte coronal del cerebro de la rata, a nivel del neostriado, ilustrando los sitios de unión al antagonista [¹²⁵I]-yodoproxifan (H₃R) y los transcritos del gen del H₃R (RNAm), identificados con una sonda antisentido marcada con ³³P. B) Distribución de sitios de unión del H₃R ([¹²⁵I]-yodoproxifan) y del ARNm del H₃R en el cerebro de la rata. La densidad de las señales autorradiográficas se expresa como la densidad óptica (OD) de los píxeles obtenidos con un analizador de imágenes. Imágenes tomadas de Pillot et al. (2002).

1.5.3. Sistema histaminérgico y Síndrome Metabólico

El primer estudio sobre el efecto de la histamina (HA) en la ingesta de alimentos fue realizado por Clineschmidt y Lotti (1973). Describieron que la administración de HA en el ventrículo lateral promovió una supresión a largo plazo de la ingesta de alimentos en los gatos. Más tarde, este efecto también se confirmó en ratas por la administración continua o aguda de HA en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y en el ventrículo lateral, respectivamente (Itowi et al., 1988). Además, la inyección intraperitoneal de L-histidina tiene un efecto similar a la HA, probablemente debido a un aumento en la síntesis y liberación de HA cerebral (Vaziri et al., 1997). La inhibición de la degradación de HA también suprime la ingesta de alimentos en ratas (Lecklin et al., 1995), mientras que la inhibición de la histidina descarboxilasa aumenta la ingesta de alimentos (Tuomisto et al., 1994). Todos estos estudios sugirieron que un aumento en el tono histaminérgico se correlaciona con una disminución en la ingesta de alimentos.

En humanos, la participación del sistema histaminérgico en la regulación del peso corporal fue descubierta por los efectos secundarios (aumento del apetito y del peso corporal) de los fármacos antipsicóticos y antidepresivos, que son potentes antagonistas del H₁R (Díaz et al., 2019). Estos hallazgos proporcionan evidencia consistente que la HA actúa como un agente anorexigénico. Por lo tanto, se han realizado varios ensayos clínicos utilizando la betahistina (análogo de la HA) en la terapia de la obesidad (NCT00459992, NCT00748436, NCT00409305 y NCT00428168). Sin embargo, en el estudio NCT00459992 la betahistina no tuvo

efecto en la ingesta de alimentos ni en el apetito (Ali et al., 2010). La betahistina (prescrita para el vértigo) actúa principalmente como un agonista del H₁R con un efecto vasodilatador; sin embargo, este fármaco también es un antagonista del H₃R, que promueve la liberación de HA de las terminaciones nerviosas histaminérgicas (Arrang et al., 1985). Dado que existe agonismo del H₁R y antagonismo del H₃R, el resultado final del uso de este fármaco es el aumento de la actividad de los H₁Rs post-sinápticos (Díaz et al., 2019). Además, el consumo de una dieta alta en grasas (HFD) altera la expresión del H₁R en el cerebro de ratas macho Wistar disminuyendo significativamente la densidad del receptor en la sustancia negra, el neostriado, el núcleo arqueado del hipotálamo, el área tegmental ventral, la corteza piriforme y la corteza motora primaria, en comparación con ratas control (Wu et al., 2013).

La participación del H₃R en la regulación del apetito es compleja, ya que su activación promueve una disminución en la liberación de varios neurotransmisores. En particular, inhibe la liberación de HA y disminuye por lo tanto la activación de los H₁Rs post-sinápticos, aumentando la ingesta de alimentos. En consecuencia, el bloqueo de los autorreceptores H₃ aumenta la liberación de HA por las neuronas histaminérgicas y, en consecuencia, la activación de los H₁Rs, lo que conduciría a disminución del apetito y de la ingesta de alimentos. Sin embargo, experimentos con administración de tioperamida (antagonista del H₃R) han mostrado disminución de la ingesta de alimentos o bien efecto nulo (Díaz et al., 2019), lo que aumenta la controversia sobre el efecto general de los H₃Rs.

El proxifan (ligando proteano del H₃R), a una dosis de 10 mg/kg por vía oral, mejoró la prueba de tolerancia a la glucosa administrada por vía intraperitoneal en ratones machos con obesidad inducida por la dieta, sin mostrar efecto en ratones *knockout* del H₃R. Por otra parte, el efecto del proxifan no fue bloqueado por el antagonista del H₁R clorfeniramina, o por el antagonista selectivo del H₂R zolantidina. Estos resultados indican que el proxifan actúa en los heterorreceptores pre-sinápticos H₃ para regular la secreción de insulina *in vivo* (Henry et al., 2011).

En otro trabajo (Takahashi et al., 2002) se observó aumento del peso corporal, la ingesta de alimento y del tejido adiposo en los ratones *knockout* del H₃R, además de aumento en la concentración de insulina y leptina, reflejando un estado de resistencia a la insulina. Estos datos sugieren que la histamina es un mediador de la homeostasis del peso corporal y de la glucosa, mediante la activación de H₃Rs.

1.6. Transmisión dopaminérgica

La dopamina es un neurotransmisor que pertenece a las catecolaminas, con participación en diversas funciones cerebrales como la recompensa, el movimiento voluntario, el estado de ánimo, la atención, la motivación, el sueño, la memoria de trabajo y el aprendizaje (Hou et al., 2014). Las neuronas dopaminérgicas inervan numerosas regiones del SNC, y se localizan principalmente en la sustancia negra compacta (SNc) y el área tegmental ventral (VTA).

El sistema dopaminérgico consta de 4 vías principales: meso-cortical (VTA → corteza frontal), meso-límbica (VTA → núcleo accumbens), nigro-estriatal (SNc → neostriado) y tubero-infundibular (hipotálamo → hipófisis). La dopamina se sintetiza por la hidroxilación del amino ácido L-tirosina produciéndose L-DOPA, que es posteriormente descarboxilada a dopamina. Una vez sintetizada, la dopamina se transporta por el VMAT-2 a las vesículas pre-sinápticas y es liberada por exocitosis. La acción de la dopamina en la sinapsis se termina principalmente al ser recapturada por el transportador de dopamina, DAT (Garris et al., 1994; Hou et al., 2014).

1.6.1. *Receptores a dopamina*

Existen cinco subtipos de receptores, agrupados en dos familias: *D₁-like* y *D₂-like* (Smythies et al., 2005; Callier et al., 2003). La familia *D₁-like* comprende los receptores D₁ y D₅, que mediante proteínas G_{αs} activan a las adenilil ciclasas, que sintetizan al segundo mensajero AMPc a partir de ATP (Lee et al., 2000; Vallone et al., 2000). La familia *D₂-like* comprende los receptores D₂, D₃ y D₄, que actúan

mediante proteínas $G\alpha_{i/o}$, e inhiben a las adenilil ciclasas y por lo tanto la síntesis de AMPc (Hou et al., 2014).

1.6.2. *Receptor D₁ (D₁R)*

Es el receptor a dopamina más abundante en el SNC. Tiene una alta afinidad por el antagonista SCH-23390, y su estimulación activa la vía AMPc/PKA, conduciendo a la fosforilación de proteínas intracelulares, incluyendo la fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc (DARPP-32). La activación del D₁R también puede estimular a la fosfolipasa C y aumentar la concentración intracelular de calcio (Undieh, 2010).

Los D₁Rs se encuentran en alta densidad en el neocórtex (Figura 3), núcleo accumbens, hipotálamo, sustancia negra reticulada, tubérculo olfatorio, corteza frontal y temporal e hipocampo; se han implicado en las funciones cognitivas de la dopamina, como el control de la memoria de trabajo y la atención, así como en el abuso de drogas (Grandy et al., 2016). La afinidad de unión de la dopamina al receptor está regulada por el trifosfato de guanosina (GTP) y los iones de calcio y magnesio, y el D₁R puede existir en estados de alta y baja afinidad por agonistas dependiendo del equilibrio entre GTP, que favorece la baja afinidad, y los cationes divalentes, que favorecen la alta afinidad (Ayano et al., 2016).

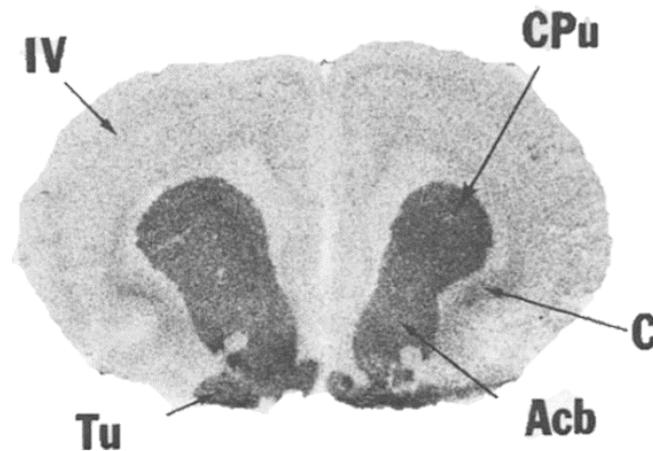


Figura 3. Expresión del D₁R en el neostriado de la ratona. Autorradiografía ilustrando los sitios de unión al antagonista del D₁R [¹²⁵I]-SCH 23982 en un corte coronal del cerebro de ratona, a nivel del neostriado. IV, lámina IV de la corteza cerebral; Acb, núcleo accumbens; CPu, caudo-putamen (neostriado). Tomado de Dawson et al. (1988).

1.6.3. Dopamina y Síndrome Metabólico

La señalización de insulina en las neuronas dopaminérgicas es importante para el equilibrio energético y en el sistema de recompensa (Khanh et al., 2014), y el deterioro de la señalización de la insulina agrava la disfunción cerebral relacionada con alteraciones en la homeostasis de la dopamina (Carvelli et al., 2002; Wei et al., 2007).

Se ha mostrado que la disminución en la concentración de insulina en el plasma de ratas reduce la acción de la hormona en las neuronas dopaminérgicas (Patterson et al., 1998). En ratones *knockout* de los receptores a insulina se observa aumento del peso corporal, de la masa grasa e hiperfagia, con

disminución de la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas del VTA y la SNc (Könner et al., 2011), y en ratas la administración de insulina aumenta la expresión del DAT (Finglewicz et al., 1994). La eliminación selectiva de los receptores a insulina en el cerebro del ratón reduce la liberación de dopamina (Kleinridders et al., 2015), y la resistencia a la insulina causada por una dieta alta en grasas exacerba la degeneración dopaminérgica en ratones (Bousquet et al., 2012).

Por otra parte, un estudio mostró que la activación de los receptores D₁ y D₂ disminuye la grasa corporal y la concentración sérica de ácidos grasos libres, glucosa e insulina (Cincotta et al., 1997; Conti et al., 2001). Freeman et al. (2001) investigaron el efecto de la glucosa en la actividad de las neuronas dopaminérgicas y observaron que la ingesta calórica influye en la actividad neuronal, mientras que van der Plasse et al. (2015) muestran que el sistema dopaminérgico es sensible a las alteraciones en el metabolismo energético. Investigaciones recientes reportan pérdida de las neuronas dopaminérgicas debido a la desregulación metabólica en ratones con obesidad inducida por una dieta crónica alta en grasas (Khang et al., 2015), y que la obesidad disminuye la liberación de dopamina en rebanadas del neocórtex de ratas hembra con obesidad inducida por la dieta (Geiger et al., 2009).

2. Planteamiento del problema

La información sobre los efectos del Síndrome Metabólico en la expresión de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) es escasa, si bien existe información indirecta. Por ejemplo, Šalković et al. (1992) mostraron que en un modelo de DM inducida por aloxano existían cambios en la densidad de los D₁Rs en el neoestriado de la rata, pero no en el tubérculo olfatorio. La diabetes inducida por aloxano es una forma de DM dependiente de insulina, y las ratas presentan aumento importante en la glucemia, la hemoglobina glucosilada, las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL, respectivamente) y el colesterol total.

Por otra parte, en un modelo de diabetes inducido por estreptozotocina en la rata se encontró una disminución en la expresión del ARNm del D₁R en el neoestriado con una disminución en la densidad de D₁Rs y un aumento de la afinidad del D₁R por el antagonista SCH-23390 (Anitha et al., 2012). En este mismo modelo se reportó un aumento en la expresión del ARNm del D₁R en la corteza cerebral de la rata (Kumar et al., 2010), y otro estudio mostró aumento en la expresión del ARNm del D₁R en el hipocampo de la rata con aumento en el número de receptores y disminución de la afinidad (Robinson et al., 2009).

La señalización dopaminérgica se ha implicado en la regulación de la ingesta de alimento, la sensibilidad a la insulina y en la homeostasis energética, y se ha reportado una reducción en la concentración y/o función de la dopamina en roedores obesos (Rada et al., 2010; Levin et al., 1997) y humanos (Stice et al., 2010; Wang et al., 2001). Las vías de recompensa se originan en el área ventral

tegmental (VTA) e inervan regiones cerebrales involucradas en la motivación (neostriado), emotividad (sistema límbico), y las funciones de orden superior (corteza frontal). El análisis funcional de los componentes del comportamiento alimenticio indica que los agonistas de los D₁Rs reducen la duración de la alimentación, principalmente al disminuir la frecuencia de la ingesta, mientras que los agonistas de los D₂Rs suprimen la alimentación en ratas privadas de alimento y en ratas con acceso a una dieta apetecible (Terry et al., 1995).

Por otra parte, la activación del H₃R en ratones disminuye la ingesta de alimentos y aumenta el gasto energético, y la administración crónica de un agonista del H₃R redujo el peso corporal, la masa grasa, la hiperleptinemia y la hiperinsulinemia en ratones con obesidad inducida por la dieta (Yoshimoto et al., 2006). Además, en ratones *knockout* del H₃R se observó aumento en el consumo de alimento, el peso corporal y en parámetros bioquímicos como la leptina y la insulina (Takahashi et al., 2002).

En la población mexicana se reportan ~8.6 millones de personas con DM, y existe evidencia de una epidemia de obesidad en las sociedades occidentales, tanto en la población adulta como infantil. Así, resulta relevante ampliar el conocimiento del Síndrome Metabólico, considerado un estado pre-diabético y factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares, una de las principales causas de muerte en México.

Por lo tanto, en este proyecto se propone investigar el efecto del Síndrome Metabólico, un estado pre-diabético, en la expresión y señalización de los receptores a dopamina D₁ y a histamina H₃, involucrados en la regulación de alimentos, y en diversas funciones cerebrales, incluyendo la motivación, el control motor y los procesos de memoria y aprendizaje.

3. Hipótesis

El Síndrome Metabólico altera la expresión de los receptores a histamina H₃ y a dopamina D₁ en el cerebro de la rata.

4. Objetivo general

Determinar el efecto del Síndrome Metabólico en la expresión de los receptores a histamina H₃ y a dopamina D₁ en la corteza prefrontal, el neocórtex y el hipocampo de la rata

4.1 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto del Síndrome Metabólico en la densidad de los receptores a histamina H₃ en la corteza prefrontal, neocórtex e hipocampo de la rata
2. Determinar el efecto del Síndrome Metabólico en la densidad de los receptores a dopamina D₁ en la corteza prefrontal, neocórtex e hipocampo de la rata

5. Metodología

5.1 Modelo de Síndrome Metabólico inducido por sacarosa en ratas

Las ratas Wistar (machos) de 25 días de edad, se dividieron en dos grupos y se mantuvieron bajo un ciclo luz:oscuridad de 12:12 h y temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). El grupo experimental (Sx Met) recibió 30% de sacarosa (azúcar comercial refinada) en el agua potable y comida para rata comercial (PicoLab Rodent Diet 20, LabDiet, St. Louis, MO) *ad libitum* durante 16 semanas. El grupo control recibió agua y comida de rata comercial *ad libitum* durante las mismas 16 semanas (Landa-Galván et al., 2020).

El estudio se realizó de acuerdo a los lineamientos éticos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (actualizada en 2011), siguiendo el protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio del Cinvestav (Protocolo # 0105-14).

5.2 Determinación de glucosa, triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL en sangre

Las ratas se mantuvieron en ayuno durante 15 h. El día del sacrificio se les administró heparina (1,000 UI/kg, ip) y se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg, ip). Los animales anestesiados se sometieron a una toracotomía, se expuso y retiró el corazón, y se tomaron muestras de sangre de la aorta seccionada. En un grupo formado por 6 ratas para cada condición se tomaron

muestras de sangre venosa de la cola de los animales previo a la administración del pentobarbital.

La concentración sérica de glucosa, triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL (HDL-C) se determinó con tiras de panel de glucosa y lípidos utilizando el analizador CardioCheck PA (PTS Diagnostics, Indianapolis, IN) como se describe por Fernández-Miranda et al. (2019).

5.3 Obtención de membranas de tejidos cerebrales de la rata

Posterior a la extirpación del corazón, las ratas se decapitaron y se obtuvo el cerebro, del cual se disecaron la corteza prefrontal, el hipocampo y el neocórtex. Los tejidos se congelaron sobre hielo seco, y se almacenaron a -70°C para su uso posterior. El día del ensayo, los tejidos se homogenizaron individualmente en 8 ml de solución Tris-HCl (10 mM, pH 7.4, 1 mM EGTA), y la suspensión se centrifugó a $140\times g$ por 10 min. El sobrenadante se centrifugó a $20,000\times g$ durante 20 min, y la pastilla (membranas) se re-suspendió en 1.5 ml de solución Tris-HCl (50 mM, pH 7.4). La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

5.4 Ensayo de saturación de la unión de radioligandos

Las membranas de neocórtex de ratas *naive* de 250-300 g ($\sim 40\ \mu\text{g}$ de proteína) se incubaron 1 h a 30°C para el H_3R ($[^3\text{H}]\text{-NMHA}$, 0.01-10 nM) o 30 min para el D_1R ($[^3\text{H}]\text{-SCH 23390}$, 0.01-10 nM) en presencia o ausencia de ligandos competidores (H_3R : R- α -metil-histamina, RAMH, 10 μM ; D_1R : SCH 23390, 10 μM).

La solución de incubación fue: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4 (H₃R) o 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4 (D₁R).

La incubación se terminó por filtración a través de papel de fibra de vidrio Whatman GF/B, previamente tratado con polietilenoimina (PEI) al 0.3% por 2 h. Los filtros se lavaron 3 veces con 1 ml de solución Tris-HCl (25 mM, pH 7.4°C) y se depositaron en viales de plástico, a los que se adicionaron 3 ml de líquido de centelleo. Después de 16 h la radiactividad retenida en los filtros (complejos ligando-receptor) se determinó por centelleometría.

La unión específica se calculó substrayendo la unión en presencia del competidor de la unión total. Los datos se ajustaron a una hipérbola por regresión no lineal, y los valores de la constante de disociación (K_d) y la unión máxima (B_{max}) se determinaron con el programa GraphPad Prism, versión 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

5.5 Ensayos de unión con una concentración de radioligando

Las membranas de corteza prefrontal, neocórtex o hipocampo (~40 µg de proteína) se incubaron por 1 h a 30°C para el H₃R ([³H]-NMHA, 1.5 nM) o 30 min para el D₁R ([³H]-SCH 23390, 1 nM) en presencia o ausencia de ligandos competidores (H₃R: RAMH, 10 µM; D₁R: SCH 23390, 10 µM). La solución de incubación fue: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4 (H₃R) o 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4 (D₁R).

El ligando libre se separó del unido al receptor por filtración, como se describió antes. La unión específica se calculó substrayendo la unión en presencia del competidor de la unión total.

5.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete Graph-Pad Prism 5. Todos los datos se expresan como promedios \pm error estándar (SEM). Para determinar diferencias entre grupos con un nivel de significancia de $P < 0.05$, el análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student, después del análisis de distribución normal con la prueba de Shapiro-Wilk.

6. Resultados

6.1 Características corporales y parámetros bioquímicos

La Tabla 1 compara las características corporales y algunos parámetros bioquímicos de las ratas de los grupos control y con consumo de sacarosa en el agua de bebida (Sx Met).

Las determinaciones mostraron en las ratas con Sx Met y en comparación con el grupo control, un aumento significativo en el peso corporal, el cociente peso corporal/longitud de la tibia, la grasa visceral, la trigliceridemia y el cociente triglicéridos/HDL, además de disminución significativa en la concentración de HDL (Tabla 1). Estos resultados concuerdan con el reporte previo de Fernández-Miranda et al. (2019).

Tabla 1. Comparación de las características corporales y parámetros bioquímicos.

	Control	Sx Met	n	P
Peso corporal (g)	556 ± 16	672 ± 24	12	0.0008
Tamaño de la tibia (cm)	4.98 ± 0.07	5.13 ± 0.11	12	0.4163
Cociente peso corporal / tibia	127.4 ± 4.9	139.3 ± 6.2	12	0.0333
Grasa visceral (g)	19.2 ± 1.8	28.9 ± 3.8	12	0.0413
Determinación en sangre				
Glucosa sangre aórtica (mg/dL)	133.5 ± 7.5	155.1 ± 16.5	12	0.249
Glucosa sangre venosa (mg/dL)	79.6 ± 2.4	70.0 ± 7.3	6	0.243
HDL (mg/dL)	48.8 ± 4.5	39.0 ± 3.4	6	0.0032
Triglicéridos (mg/dL)	72.2 ± 3.9	126.7 ± 11.7	12	0.0002
Cociente Triglicéridos / HDL	1.56 ± 0.11	3.04 ± 0.52	6	0.021

Los valores son promedio ± SEM del número de animales indicado (*n*). HDL, lipoproteínas de alta densidad. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student. En negritas se indican los valores de *P* indicativos de diferencias significativas.

6.2 Determinación de la constante de disociación (Kd) de la [³H]-NMHA y el [³H]-SCH 23390 en membranas del neocórtex de ratas *naive*

A fin de determinar la afinidad por los radioligandos respectivos de los receptores H₃ y D₁ presentes en los tejidos cerebrales en estudio, se realizaron ensayos de unión de radioligando en membranas del neocórtex (Figura 4). Para el agonista de los H₃Rs [³H]-NMHA se obtuvo un valor de Kd de 1.39 ± 0.3 nM y una unión máxima (Bmax) de 153 ± 9 fmol/mg de proteína, mientras que para el antagonista de los D₁Rs [³H]-SCH 23390 el valor de Kd correspondió a 0.84 ± 0.14 nM con Bmax de 960 ± 48 fmol/mg de proteína.

Con base en estos resultados, los ensayos de unión con una concentración única de radioligando se realizaron con concentraciones similares a los valores de Kd ([³H]-NMHA, 1.5 nM; [³H]-SCH 23390, 1 nM), que corresponderían a ~50% de ocupancia de los receptores presentes en las membranas de los tejidos.

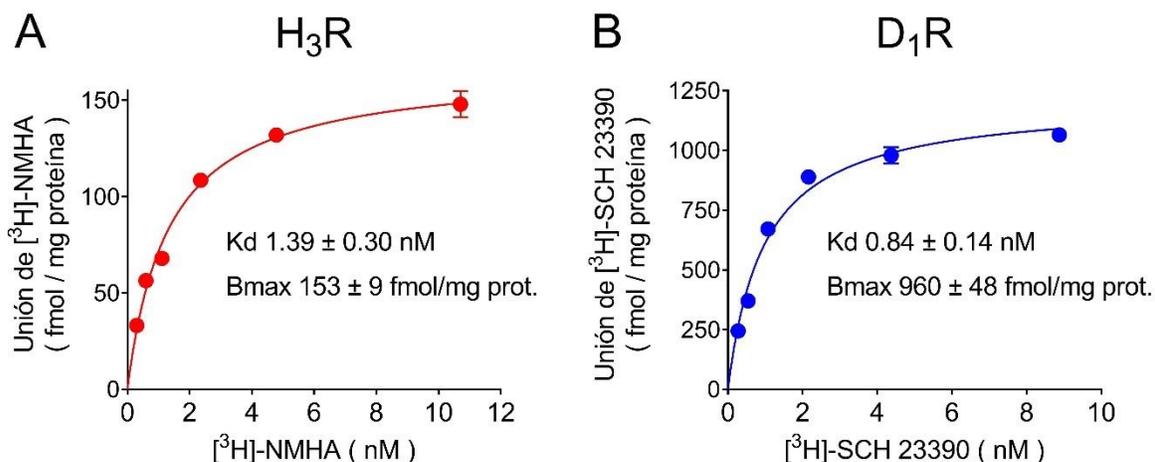


Figura 4. Unión saturante de [³H]-NMHA o [³H]-SCH 23390 a membranas del neoestriado de la rata. A. [³H]-NMHA. Las membranas se incubaron con las concentraciones indicadas de [³H]-NMHA en ausencia y presencia de RAMH (10 μM), y la unión específica del H₃R se determinó restando la unión en presencia de RAMH (unión inespecífica) de la unión total. **B.** Unión de [³H]-SCH-23390. Las membranas se incubaron con las concentraciones indicadas de [³H]-SCH-23390 en ausencia y presencia de SCH-23390 (10 μM), y la unión específica del receptor se determinó restando la unión en presencia de SCH-23390 de la unión total. En ambas figuras los valores son promedios ± SEM de determinaciones por triplicado de un experimento representativo, y la línea es el mejor ajuste a una hipérbola. Los valores de la constante de disociación (Kd) y de la unión máxima (Bmax) son promedios ± SEM de 3 experimentos.

6.3 Expresión del H₃R en el neocóstriado, la corteza prefrontal e hipocampo de ratas control y experimentales

Los ensayos mostraron que no existió diferencia en la densidad de los H₃Rs en la corteza prefrontal y el hipocampo entre los grupos control y experimental (Figura 5, paneles A y C). Sin embargo, en las membranas del neocóstriado se advirtió una disminución significativa (Figura 5B), con valores de 73.7 ± 4.4 y 55.2 ± 6.2 fmol/mg proteína, para los grupos control y Sx Met, respectivamente.

6.4. Expresión del D₁R en el neocóstriado, la corteza prefrontal e hipocampo de ratas control y experimentales

La densidad de D₁Rs fue significativamente menor en las membranas del neocóstriado de las ratas del grupo Sx Met (Figura 6B), con valores de 171.8 ± 14.1 y 95.3 ± 9.7 fmol/mg proteína, respectivamente. En contraste, no se advirtieron diferencias significativas en las membranas de la corteza prefrontal y el hipocampo (Figura 6, paneles A y C).

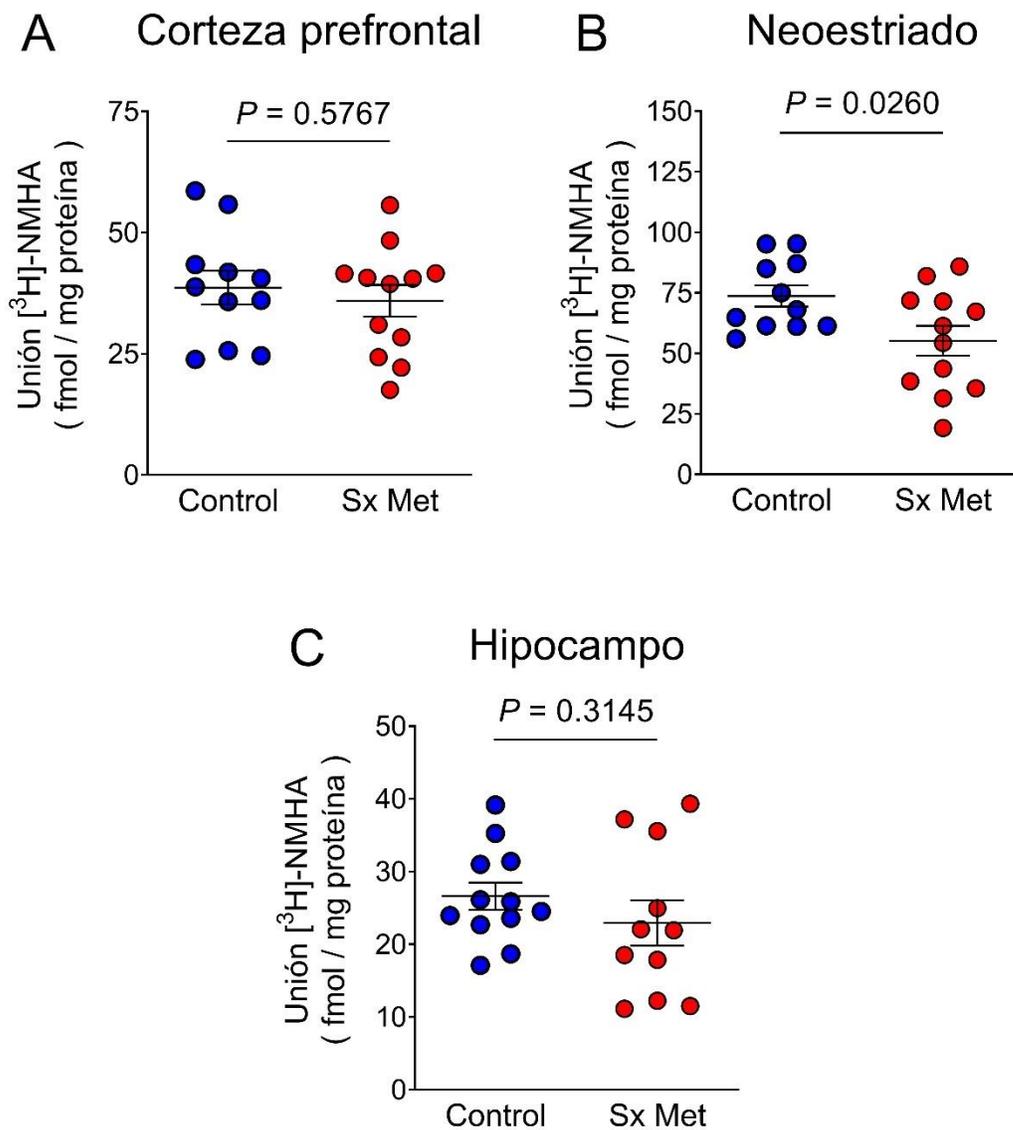


Figura 5. Densidad de H₃Rs en membranas de la corteza prefrontal, el neocortiado y el hipocampo de ratas control y con Sx Met. **A.** Unión de [³H]-NMHA a membranas de la corteza prefrontal. **B.** Unión de [³H]-NMHA a membranas del neocortiado. **C.** Unión de [³H]-NMHA a membranas del hipocampo. Las membranas se incubaron con [³H]-NMHA (1.5 nM) en ausencia y presencia de RAMH (10 μM), y la unión específica del receptor se determinó restando la unión en presencia de RAMH de la unión total. Los puntos indican valores individuales (promedio de cuadruplicados), y las líneas indican el promedio ± SEM de los grupos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

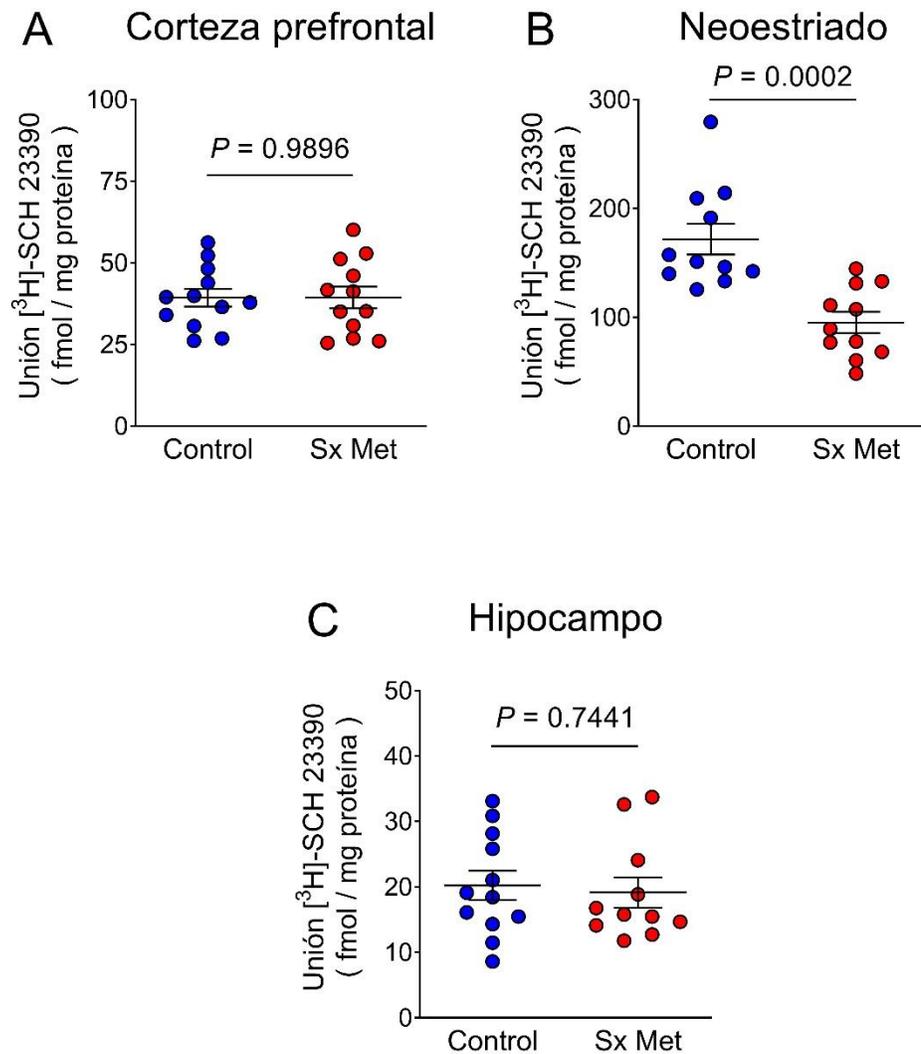


Figura 6. Densidad de D₁Rs en membranas de la corteza prefrontal, el neostriado y el hipocampo de ratas control y con Sx Met. **A.** Unión de [³H]-SCH-23390 a membranas de la corteza prefrontal. **B.** Unión de [³H]-SCH-23390 a membranas del neostriado. **C.** Unión de [³H]-SCH-23390 a membranas del hipocampo. Las membranas se incubaron con [³H]-SCH-23390 (1 nM) en ausencia y presencia de SCH 23390 no marcado (10 μM), y la unión específica del receptor se determinó restando la unión en presencia de SCH 23390 de la unión total. Los puntos indican valores individuales (promedio de cuadruplicados), y las líneas indican el promedio ± SEM de los grupos. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.

7. Discusión

En este trabajo se reprodujo el modelo de Sx Met inducido en ratas por la presencia de sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 16 semanas, y se determinó mediante ensayos de unión de radioligando la expresión de los receptores a histamina H₃ y a dopamina D₁ en tres regiones del cerebro de la rata, corteza prefrontal, neocórtex e hipocampo.

El principal hallazgo fue la disminución significativa de la densidad de ambos receptores en el neocórtex, sin cambios en las otras dos regiones.

7.1. Modelo de Síndrome Metabólico en ratas Wistar

En comparación con el grupo control, los animales del grupo experimental mostraron un aumento significativo en el peso, la grasa visceral, el cociente peso corporal/longitud de la tibia, triglicéridemia, el cociente triglicéridos/HDL, así como una disminución significativa en la concentración sanguínea de HDL (Tabla 1). Estos datos indican alteraciones que corresponden a las descritas en el modelo de Sx Met descrito por Landa-Galván et al. (2020), y muestran que la administración de sacarosa al 30% en el agua de beber durante 16 semanas induce características del síndrome en las ratas.

De acuerdo con los criterios unificados, se requieren tres de los cinco criterios establecidos para el diagnóstico de Sx Met en humanos (Alberti et al., 2009). Las ratas experimentales presentan un aumento en el peso corporal, la grasa visceral y el cociente peso corporal/longitud de la tibia, indicando que el aumento en el

peso de las ratas no se debe a un incremento en el tamaño, sino que está relacionado con el desarrollo de obesidad. Además, estos animales presentaron hipertrigliceridemia y disminución en la concentración de HDL. Así, el grupo experimental presentó tres características que corresponderían a los criterios diagnósticos del Sx Met en humanos (Tabla 1).

El aumento del peso corporal en el grupo con Sx Met está relacionado con el incremento en la acumulación de grasa visceral, y de acuerdo con la fisiopatología del Sx Met, la obesidad central es una característica relevante del síndrome (McCracken et al., 2018). A nivel mundial la prevalencia de obesidad y sobrepeso en adultos ha aumentado en los últimos años, particularmente en el hemisferio occidental, debido a la alimentación y a la vida sedentaria, conduciendo a que la obesidad sea uno de los criterios más frecuente del Sx Met (Engin, 2017). Además, la obesidad representa un factor de riesgo para varias enfermedades, principalmente cardiovasculares, diabetes y cáncer. Así, en el modelo de Sx Met en la rata utilizado en este proyecto los datos obtenidos indican que el aumento en el peso corporal se encuentra relacionado con la acumulación de grasa visceral (Tabla 1).

La acumulación de tejido adiposo en órganos y tejidos como el hígado, el páncreas, el músculo esquelético y el músculo cardíaco está directamente relacionada con el desarrollo de resistencia a la insulina, es decir, disminución de su función biológica requiriéndose un alto nivel plasmático de dicha hormona (hiperinsulinemia) para mantener un adecuado metabolismo de los hidratos de

carbono, proteínas y lípidos (Avramoglu et al., 2006). En las ratas con Sx Met (Tabla 1) la concentración sérica de glucosa en la sangre venosa no aumentó de manera significativa, lo que podría explicarse por la hiperinsulinemia mostrada previamente por Landa-Galván et al. (2020).

En la sangre arterial de las ratas con Sx Met la concentración sérica de glucosa presentó un aumento, aunque no fue estadísticamente significativo (Tabla 1). Cabe destacar que la toma de la muestra de sangre arterial fue posterior a la administración del anestésico pentobarbital. Furner et al. (1972) reportaron que la administración sistémica de pentobarbital a la concentración utilizada en este proyecto aumenta la concentración sérica de glucosa en ratas, por lo cual se determinó en un subgrupo de ambos grupos (control y experimental) la glucemia en muestra de la sangre venosa de la cola, previo a la administración del anestésico. La glucemia pre-anestesia (venosa) fue menor a la glucemia arterial post-anestesia; sin embargo, no existió diferencia significativa entre los animales del grupo control y las ratas del grupo experimental (Tabla 1).

La resistencia a la insulina es el denominador común en el desarrollo del Sx Met, y su principal contribuyente es el exceso de ácidos grasos libres circulantes, que se derivan de las reservas de triglicéridos del tejido adiposo por acción de la lipasa hormono-sensible dependiente de AMPc, o bien de la lipólisis de las lipoproteínas ricas en triglicéridos por efecto de la lipasa de lipoproteínas (Langin, 2005). La hipertrigliceridemia es una de las características principales del modelo de Sx Met en la rata (Tabla 1), y se debe al alto consumo de carbohidratos (azúcar en el

agua de bebida) que conduce a la síntesis aumentada de triglicéridos (Panchal et al., 2010). Lo anterior resulta en un mayor riesgo cardiovascular con alteración de la función endotelial, proliferación vascular de células del músculo liso y dislipidemia, que se caracteriza por disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) debido al aumento en la síntesis hepática de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por aumento en la concentración de triglicéridos (Eckel et al., 2010). Esta dislipidemia es evidente en las ratas con Sx Met (Tabla 1).

La hipertrigliceridemia y el aumento en la concentración plasmática de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son dos anomalías metabólicas asociadas con el estado de resistencia a la insulina (McCracken et al., 2018). Estudios previos han mostrado que el aumento en el cociente de las concentraciones de triglicéridos y de las lipoproteínas de alta densidad (TG/HDL) está estrechamente relacionado con la resistencia a la insulina, y en humanos la relación TG/HDL se identificó como un parámetro subrogado de resistencia a la insulina y un predictor de DM, enfermedad coronaria e infarto al miocardio (Yeh et al., 2019).

En este trabajo, el cociente TG/HDL de las ratas con Sx Met fue significativamente mayor que el de los animales control (Tabla 1) y este dato, en conjunto con la hiperinsulinemia (Landa-Galvan et al., 2020), reflejan el estado de resistencia a la insulina de las ratas con Sx Met, así como el riesgo de alteraciones cardiometaabólicas.

7.2. Determinación de la constante de disociación (Kd) de la [³H]-NMHA y el [³H]-SCH 23390 en membranas del neostriado de ratas *naïve*

Para caracterizar a los radioligando [³H]-NMHA y [³H]-SCH 23390 se realizaron ensayos de unión saturante en membranas del neostriado de ratas *naïve* adultas (250-300 g), con base en estudios previos que indican una alta expresión del RH₃ y del RD₁ en esta región (Figuras 2 y 3; Pillot et al., 2002, y Dawson et al., 1988). Además, el acceso, reconocimiento y disección de este núcleo son sencillos.

Las curvas de saturación de la unión de [³H]-NMHA (H₃R) o [³H]-SCH 23390 (D₁R) en membranas del neostriado de la rata indicaron para [³H]-NMHA un valor de Kd (concentración de ligando que se necesita para ocupar el 50% de los receptores) de 1.39 ± 0.30 nM y una Bmax (densidad máxima de sitios de unión del ligando) de 153 ± 9 fmol/mg proteína, y para [³H]-SCH 23390 un valor de Kd de 0.84 ± 0.14 nM y una Bmax de 960 ± 48 fmol/mg proteína.

Para la [³H]-NMHA el valor de Kd es semejante al obtenido en el laboratorio para membranas de sinaptosomas del neostriado de la rata (0.95 ± 0.08 nM; Molina-Hernández et al., 2000) y del núcleo completo (0.60 ± 0.20 nM, Sánchez-Lemus y Arias-Montaño, 2004). Para la unión de [³H]-SCH 23390 el valor de Kd se encuentra dentro del rango reportado para el neostriado (0.35 ± 0.03 nM, Klimek et al., 1987; 0.49 ± 0.03 nM, Hess et al., 1986; 2.3 ± 0.4 nM, Sánchez-Lemus y Arias-Montaño, 2004).

Con base a los datos obtenidos de la caracterización de los radioligandos, la concentración de radioligando que se utilizó en los siguientes experimentos fue cercana al valor de la K_d obtenida ($[^3H]$ -NMHA, 1.5 nM, $[^3H]$ -SCH 23390, 1 nM), con una ocupación de ~50% del total de receptores presentes en las preparaciones membranales.

7.3 Expresión del H₃R en el neocórtex, la corteza prefrontal y el hipocampo de ratas control y experimentales

El H₃R se expresa principalmente en las neuronas y en muy baja densidad en las células gliales. La distribución del H₃R en el SNC se ha estudiado mediante hibridación *in situ* (ARNm), la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR; detección del ARNm) y autorradiografía (sitios de unión) en roedores, humanos y monos (Tardivel-Lacombe et al., 2001; Pillot et al., 2002; Sallmen et al., 2003).

Los estudios de hibridación *in situ* indican una expresión muy alta del ARNm del H₃R en la corteza cerebral (principalmente en la lámina V, con menor expresión en las láminas superficiales), el hipocampo (capas piramidales CA1 y CA3 ventral del cuerno de Ammon), y el neocórtex, dividido en caudado y putamen en el humano y los primates (ver Figura 2; Pillot et al., 2002; Nieto-Alamilla et al., 2016).

Los estudios de unión de radioligandos muestran una distribución de H₃R similar en cerebros de primates y roedores. El receptor se expresa ampliamente, pero con densidad heterogénea, en el SNC y se encuentran niveles altos en la corteza

cerebral (excepto en la capa V), *tenia tecta*, núcleo accumbens, neocortical, hipocampo, núcleo del lecho de la estría terminal, núcleos olfatorios, algunos núcleos hipotalámicos (principalmente TMN), amígdala y corteza piriforme. En contraste con la expresión de ARNm, se observa una alta densidad de sitios de unión en el globo pálido y la sustancia negra reticulata (SNr). Una baja densidad de sitios de unión se detecta en el *locus coeruleus* y los núcleos del raquí, mientras que el cerebelo y la glándula pituitaria están escasamente marcados (Figura 2; Martínez-Mir et al., 1990; Pollard et al., 1993; Anichtchik et al., 2000; Pillot et al., 2002).

Con base en los reportes de densidad del RH₃ en las diferentes regiones del cerebro de la rata (Figura 2), en este proyecto se seleccionaron tres regiones con una densidad alta o media de receptores (corteza prefrontal, neocortical e hipocampo) para determinar el efecto del Sx Met en la densidad del H₃R. Los resultados de esta tesis mostraron una alta expresión del H₃R en el neocortical y una moderada expresión en la corteza prefrontal y en el hipocampo, datos que concuerdan con lo reportado en estudios previos (Figuras 2A, 2B y 5).

En el grupo con Sx Met la densidad del H₃R no mostró diferencia en comparación con los animales del grupo control en la corteza prefrontal y el hipocampo. Sin embargo, para el neocortical se encontró una menor densidad (-25%), estadísticamente significativa, en el grupo con Sx Met (73.7 ± 4.4 y 55.2 ± 6.2 fmol/mg proteína, para los grupos control y Sx Met, respectivamente; Figura 5).

Se ha descrito que una dieta alta en grasas disminuye la expresión del H₁R en el neoestriado de la rata (Wu et al., 2013), sugiriendo que cambios en la composición de la dieta modifican la expresión de los receptores a histamina de este núcleo y que el neoestriado es una región vulnerable a cambios metabólicos.

La localización del H₃R es principalmente pre-sináptica, ya sea como autorreceptor o como heterorreceptor, pero hay evidencia de una ubicación post-sináptica de los H₃Rs en el neoestriado, la corteza cerebral, el hipocampo, el núcleo accumbens, el hipotálamo lateral y la zona incerta (González-Sepúlveda et al., 2013; Panula y Nuutinen, 2013; Parks et al., 2014). Los datos de este proyecto para la densidad del H₃R se obtuvieron con membranas de las regiones cerebrales de interés, lo que no permite diferenciar la localización pre- o post-sináptica del receptor. Sin embargo, la contribución de los H₃Rs pre-sinápticos puede evaluarse con estudios de unión de radioligando en membranas de sinaptosomas, que contienen primordialmente a los receptores localizados en las terminales nerviosas.

Los autorreceptores H₃ inhiben la liberación de histamina en diversas regiones del SNC (Arrang et al., 1983; Nieto-Alamilla et al., 2016). Diversos estudios han descrito la participación del sistema histaminérgico en la regulación del peso corporal con base en los efectos secundarios de antipsicóticos y antidepresivos, que son potentes antagonistas del H₁R, proporcionando evidencia que la HA actúa como un agente anoréxigénico. Con base en estos hallazgos se han realizado varios ensayos clínicos en la terapia de la obesidad utilizando a la betahistina

(análogo de la HA), que actúa como agonista del H₁R y antagonista del H₃R, por lo que aumenta la liberación de HA por efecto sobre el H₃R y por lo tanto la actividad del H₁R (Díaz et al., 2019).

La contribución del H₃R a la regulación del apetito es compleja. Como se mencionó, la activación del receptor inhibe la liberación de HA y en consecuencia la activación de H₁Rs post-sinápticos, disminuyendo el apetito y la ingesta de alimentos. Además, en ratones macho la administración de imetit (agonista del H₃R) disminuyó la ingesta de alimento y el peso corporal, y estos efectos no se observaron en ratones H₃R-ko (Yoshimoto et al., 2006). En contraste, en otro estudio la administración del antagonista tioperamida disminuyó la ingesta de alimentos o bien no tuvo efecto (Díaz et al., 2019). Esta información indica la complejidad de la participación del H₃R en la regulación del peso corporal y la ingesta de alimentos.

Por otra parte, Henry et al. (2011) mostraron que la administración de proxifan (agonista proteano del H₃R) mejoró la prueba de tolerancia a la glucosa en ratones macho con obesidad inducida por la dieta (DIO), efectos que no se observaron en ratones H₃R-ko, indicando que el proxifan actúa en los heterorreceptores H₃ pre-sinápticos para regular la secreción de la insulina *in vivo*. En otro estudio, en ratones H₃R-ko se observó un aumento del peso corporal, la ingesta de alimento y el tejido adiposo, además de concentraciones plasmáticas de insulina y leptina aumentadas (Takahashi et al., 2002). En conjunto, estos datos indican la participación del H₃R en la regulación de la glucosa.

Por otra parte, existe evidencia de la localización post-sináptica de los H₃R en algunas áreas del cerebro, como el neocórtex, la corteza cerebral, el hipocampo, el núcleo accumbens, el hipotálamo lateral y la zona incerta (Nieto-Alamilla et al., 2016). En rebanadas del hipocampo de la rata, la activación del H₃R estimula la vía de las MAPKs en las neuronas piramidales de la región CA3, y la activación de estas cinasas parece ser necesaria para la mejoría y consolidación de la memoria inducida por el H₃R posterior al condicionamiento contextual del miedo en ratas (Giovannini et al., 2003). En células SK-N-MC transfectadas con el H₃R humano, la activación del receptor estimula la actividad de la vía Akt/GSK3 β , y en neuronas corticales de la rata la estimulación del H₃R resulta en la fosforilación de Akt en la Ser⁴⁷³ y de GSK3 β en la Ser⁹, mediante la activación de las vías PI3K y MAPK (Mariottini et al., 2009). La cinasa Akt regula la expresión de inhibidores de la apoptosis como Bcl-2 y Bcl-x, y por lo tanto promueve la supervivencia de las células neuronales. Además, en las neuronas corticales de rata, la activación del H₃R aumenta la expresión de Bcl-2 de manera dependiente de Akt (Song et al., 2004).

La vía Akt/GSK3 β tiene una función relevante en la regulación de varios procesos celulares importantes, incluida la plasticidad sináptica y la supervivencia celular, la proliferación y el metabolismo. Por su parte, la activación del H₃R ejerce un efecto protector contra la muerte celular inducida por privación de suero en neuronas corticales de la rata y la neurotoxicidad inducida por NMDA en cultivos mixtos de células corticales de ratón a través de la activación de la vía PI3K-Akt (Mariottini et al., 2009).

En conjunto, esta información indica la participación del H₃R en la activación de vías como MAPK/Akt/GSK3 β . Por lo tanto, la disminución de la densidad del H₃R en el neocórtex de las ratas con Sx Met podría afectar la regulación de la plasticidad sináptica y el metabolismo y la supervivencia celular, por reducción del efecto protector del H₃R contra la neurotoxicidad.

Determinar el efecto del Sx Met sobre los H₃Rs pre- y post-sinápticos del neocórtex permitiría evaluar los mecanismos celulares involucrados en la disminución de la densidad del receptor.

7.4 Expresión del D₁R en el neocórtex, la corteza prefrontal e hipocampo de ratas control y experimentales

El D₁R es el GPCR más abundante en el SNC. Se encuentra en alta densidad en áreas meso-límbicas, nigro-estriatales y meso-corticales, como el neocórtex, el núcleo accumbens, el hipotálamo, la sustancia negra reticulada, el tubérculo olfatorio, la corteza frontal y temporal, y se expresa en baja densidad en el cerebelo, el hipocampo, el tálamo, el hipotálamo, así como en tejidos periféricos, como el riñón. Se ha implicado al D₁R en la regulación de movimientos voluntarios, el crecimiento y el desarrollo, la alimentación, la afectividad, la recompensa, el sueño, el control de impulsos, y las conductas reproductivas. Además, se le relaciona con la regulación por la dopamina de las funciones cognitivas, como el control de la memoria de trabajo, el aprendizaje de hábitos y la atención, así como en el abuso de drogas (Ayano, 2016).

La distribución del D₁R en el SNC se ha evaluado mediante hibridación *in situ* (ARNm) en cerebros humanos normales *post mortem* y por autorradiografía (sitios de unión) en roedores y humanos. Los estudios de hibridación *in situ* reportan niveles muy altos del ARNm en el neocórtex, moderados en la corteza cerebral y baja en el hipocampo (Hurd et al., 2001). Los resultados de unión de radioligando confirman la alta densidad del receptor en el neocórtex y una densidad moderada-baja en el hipocampo con prevalencia en el giro dentado (Camps et al., 1990).

Con base en los reportes previos de la expresión del D₁R en el neocórtex, la corteza prefrontal y el hipocampo, se determinó la expresión del receptor en las ratas control y con Sx Met. En el grupo control se confirmó la muy alta densidad del receptor en el neocórtex, así como la moderada expresión en la corteza prefrontal y la baja expresión en el hipocampo. Sin embargo, en el proyecto se utilizó la totalidad del hipocampo y no determinó la expresión en el giro dentado, la región de esta estructura con mayor densidad del D₁R en diferentes especies (Camps et al., 1990).

Los resultados de este estudio mostraron que en las ratas con Sx Met no existe diferencia significativa en la expresión del D₁R en la corteza cerebral prefrontal y el hipocampo (Figura 6). Sin embargo, en estas regiones la expresión del receptor es moderada y baja, respectivamente, por lo que observar alteraciones en la densidad del D₁R requeriría probablemente de cambios marcados.

En contraste, en el neoestriado de las ratas con Sx Met se observó una disminución altamente significativa (-45%) en comparación con los animales del grupo control (171.8 ± 14.1 y 95.3 ± 9.7 fmol/mg proteína, respectivamente) (Figura 6).

Estudios previos en un modelo de DM tipo 1, inducida por estreptozotocina en la rata, mostraron aumento en la expresión del ARNm y la densidad del D₁R en la corteza cerebral (Kumar et al., 2010) y en el hipocampo (Robinson et al., 2009). En la corteza cerebral el aumento en el ARNm del D₁R fue revertido por la administración sistémica de insulina (Kumar et al., 2010), mientras que en el hipocampo la administración de insulina no modificó el aumento en el ARNm y la densidad del D₁R (Robinson et al., 2009).

Para la corteza cerebral, debe considerarse que en el estudio de Kumar et al. (2010) se utilizó la totalidad de la corteza cerebral y en este proyecto se determinó la densidad del D₁R en la corteza prefrontal, por lo que los resultados divergentes podrían deberse a la región analizada.

Para el neoestriado, la disminución en la densidad del D₁R encontrada en este trabajo concuerda con la reducción en la expresión del RNAm del receptor reportada para el mismo núcleo en un modelo de DM1 en la rata, efecto revertido parcialmente por la administración de insulina (Anitha et al., 2012).

En conjunto, los estudios de Kumar et al. (2010), Robinson et al. (2009) y Anitha et al. (2012) indican que la DM afecta la expresión del D₁R, dependiendo de la región

cerebral, y los resultados de esta tesis indican que el cambio en la densidad del D₁R en el neoestriado se presenta incluso antes del establecimiento de la DM.

Šalković et al. (1995) mostraron que la administración intracerebroventricular a bajas dosis (no diabetogénicas) de aloxano y estreptozotocina alteraba el sistema dopaminérgico de la rata, con un aumento significativo de los niveles de dopamina en el neoestriado y una disminución significativa en la densidad del D₁R, pero no del D₂R. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en esta tesis para el grupo con Sx Met (estado pre-diabético), con disminución significativa en la densidad del D₁R en el neoestriado.

De manera relevante, la administración intracerebroventricular de dosis no diabetogénicas de aloxano y estreptozotocina aumenta los niveles de dopamina en el cerebro de la rata, y el efecto es similar al producido por la administración periférica de dosis diabetogénicas de estos fármacos (Lackovi y Šalković, 1989), lo que sugiere alteraciones en la señalización por insulina en el cerebro. Los datos de obtenidos en este trabajo indican cambios en la densidad del D₁R previos al establecimiento de la DM, y que el neoestriado presenta una mayor vulnerabilidad en comparación con la corteza prefrontal y el hipocampo a alteraciones metabólicas, como la resistencia a la insulina y la DM.

Kleinridders et al. (2015) reportan que en ratones *knockout* del receptor de insulina cerebral (NIRKO) disminuyó el ancho y la amplitud del pico de liberación de dopamina evocada en el neoestriado y en el núcleo accumbens, evaluada por amperometría. Además, estas regiones presentaron disfunción mitocondrial

cerebral con reducción de la actividad oxidativa mitocondrial, niveles aumentados de especies reactivas de oxígeno (ROS) y mayor oxidación de lípidos y proteínas. Lo anterior sugiere que cambios en el metabolismo energético afectan la liberación de dopamina, y que están involucrados mecanismos de estrés oxidativo. Así, el estrés oxidativo podría estar involucrado en la disminución en la densidad del D₁R observada en este proyecto en el neoestriado de las ratas con Sx Met, sugiriendo la existencia de procesos de daño neuronal.

La dopamina tiene una función central en el aprendizaje de asociaciones de recompensa alimentaria. En modelos animales la activación de los receptores a dopamina y la señalización intracelular subsecuente en el neoestriado y el núcleo accumbens son críticas para la formación de hábitos y las conductas motivadas. El núcleo accumbens es una de las regiones clave del circuito de recompensa y clásicamente se postula que las neuronas espinosas medianas que expresan el D₁R transmiten señales de recompensa, mientras que las neuronas espinosas medianas que expresan el D₂R codifican la aversión (Soares-Cunha et al., 2019). Por lo tanto, alteraciones en la densidad y función del D₁R podrían influir en los hábitos alimentarios (Guo et al., 2014). El estriado dorsal (neoestriado) y el estriado ventral (núcleo accumbens) no difieren en su citoarquitectura (Heimer y van Hoesen, 1979), por lo cual sería interesante para este proyecto determinar si el Sx Met también modifica la densidad del D₁R en el núcleo accumbens.

7.5 Posibles mecanismos del efecto del Síndrome Metabólico en la función cerebral

7.5.1 Posible resistencia a la insulina cerebral en ratas con Sx Met

El Sx Met se considera un estado pre-diabético caracterizado por un estado de resistencia a la insulina (RI). En el modelo de Sx Met inducido en las ratas por el consumo de sacarosa al 30% en el agua de beber durante 16 semanas, los resultados de Landa-Galván et al. (2020) muestran alteración de la concentración sérica de insulina (hiperinsulinemia), sugiriendo la inducción de RI.

Existen estudios que sugieren una asociación entre la RI periférica y la conexión hígado-cerebro (Tong et al., 2009; De la Monte et al., 2012; Sartorius et al., 2014). En este sentido, una dieta alta en grasas durante 12 semanas induce deterioro de la sensibilidad a la insulina cerebral y de sus vías de señalización (Pratchayasakul et al., 2011). Una posible explicación es que la RI periférica conduce a un aumento en la producción de lípidos hepáticos, específicamente de las ceramidas, generadas a partir de ácidos grasos y esfingosinas, y que por lo tanto atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica, BHE (Tong et al., 2009, Sartorius et al., 2014 y Arboleda et al., 2007). En este mismo estudio se reporta una reducción en la expresión de proteínas relacionadas con la señalización de la insulina y deterioro de la depresión a largo plazo (LTD) inducida por insulina (Arboleda et al., 2007).

7.5.2 Obesidad y resistencia a la insulina cerebral en el Sx Met

Una característica del modelo de Sx Met es la obesidad, representada por el aumento en el peso corporal relacionado con la acumulación de grasa visceral (Landa-Galván et al., 2020).

La inflamación sistémica y el estrés oxidativo durante la obesidad podrían estar involucrados en el daño a la BHE. Banks et al. (2012) observaron que la inflamación sistémica o el estrés oxidativo disminuían la expresión de las proteínas de las uniones estrechas (*tight junctions*) en la BHE, aumentando la permeabilidad al cerebro. Lo anterior sugiere que condiciones patológicas sistémicas que ocurren con obesidad podrían inducir a patologías cerebrales.

Además, la obesidad inducida por el consumo crónico de una dieta alta en grasas induce RI cerebral, con disminución en la fosforilación de los receptores a insulina y del sustrato del receptor a insulina (IRS), y de la señalización corriente abajo mediada por las vías PI3K-Akt, GSK3 β y AMPK (Pratchayasakul et al., 2011, Pipatpiboon et al., 2012; Arnold et al., 2014). Asimismo, existe pérdida de la función inhibidora de factores de transcripción, como FoxO, que normalmente modulan el metabolismo celular y la autofagia (Guo et al., 2014).

La RI inducida por la obesidad puede deberse al deterioro de la función mitocondrial en el cerebro, como lo indica el aumento de la producción de ROS mitocondriales, la despolarización de la membrana mitocondrial y mayor permeabilidad mitocondrial (Pipatpiboon et al., 2012, Pintana et al., 2014;

Sa-nguanmoo et al., 2016). En las mitocondrias del cerebro de ratones obesos resistentes a la insulina y de ratas diabéticas Zucker se observa disminución de la función mitocondrial y reducción del contenido de ATP (Wang et al., 2015; Raza et al., 2015). Además, se detecta apoptosis de las células cerebrales por alteración de proteínas relacionadas como Bax, Bad y Bcl-2 (Nuzzo et al., 2015; Raza et al., 2015). Estos hallazgos sugieren que la actividad mitocondrial del cerebro y la señalización de la insulina cerebral tienen una comunicación bidireccional para regular la función normal del cerebro.

La obesidad causada por el consumo de una HFD no solo indujo inflamación sistémica, sino que también causó inflamación cerebral, como lo muestra el aumento de citocinas pro-inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$ y $\text{NF-}\kappa\text{B}$), y estrés oxidativo en el tejido cerebral, indicado por la elevación de productos de aldehídos (Chunchai et al., 2016, Raza et al., 2015).

Todos estos hallazgos sugieren que la obesidad puede aumentar tanto la inflamación sistémica como el estrés oxidativo, y ambos eventos pueden conducir al desarrollo de RI periférica y central, y disfunción cerebral. Así, la disminución en la expresión del D_1R y del H_3R en el neocórtex de las ratas con Sx Met observada en este trabajo puede implicar algunas de las alteraciones observadas en la obesidad y la RI, con cambios en las vías de señalización de la insulina, así como estrés oxidativo cerebral, que conducirían a lesión neuronal.

8. Conclusión

En un modelo experimental en la rata, el Síndrome Metabólico disminuye la densidad de los receptores a dopamina D₁ y a histamina H₃ en el neocórtex, y no en la corteza prefrontal o el hipocampo.

9. Perspectivas

Las perspectivas del proyecto son:

1. Determinar el efecto del Síndrome Metabólico en la afinidad por dopamina de los receptores D₁ en el neostriado de la rata, mediante ensayos de competencia de la unión de radioligando.
2. Determinar el efecto del Síndrome Metabólico en la señalización de los receptores D₁ en el neostriado, mediante ensayos de formación de AMPc.
3. Evaluar el efecto del Síndrome Metabólico en la afinidad por histamina de los receptores H₃ en el neostriado de la rata.
4. Determinar el efecto del Síndrome Metabólico en la señalización de los receptores H₃ en el neostriado, mediante ensayos de formación de AMPc y/o fosforilación de ERK-1/2.
5. Determinar el efecto del Síndrome Metabólico en la densidad y señalización de los receptores D₁ y H₃ en el núcleo accumbens.

10. Bibliografía

- Ahima, R. S. (2016). 'Overview of Metabolic syndrome'. Ahima, R.S. (ed.). *Metabolic syndrome: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Springer, pp. 3-12.
- Alberti, K. G. M. M., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J., Philip, T., Loria, C., Smith Jr, S. C. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 120, 1640-1645.
- Alberti, K. G. M., Zimmet, P., Shaw, J. (2006). The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. Brussels. *IDF International Diabetes Federation*, 23, 469–480.
- Alberti, K. G., Zimmet, P., Shaw, J., IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. (2005). The metabolic syndrome a new worldwide definition. *Lancet*, 366, 1059–1062.
- Ali, A. H., Yanoff, L. B., Stern, E. A., Akomeah, A., Courville, A., Kozlosky, M., Brady, S. M., Calis, K., Reynolds, J., Crocker, K. M., Yanovski, J., Barak, N. (2010). Acute effects of betahistine hydrochloride on food intake and appetite in obese women: a randomized, placebo-controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 1290-1297.
- Anichtchik, O. V., Huotari, M., Peitsaro, N., Haycock, J. W., Männistö, P. T., Panula, P. (2000). Modulation of histamine H₃ receptors in the brain of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *European Journal of Neuroscience*, 12, 3823-3832.

- Anitha, M., Abraham, P. M., Paulose, C. S. (2012). Striatal dopamine receptors modulate the expression of insulin receptor, IGF-1 and GLUT-3 in diabetic rats: effect of pyridoxine treatment. *European Journal of Pharmacology*, 696, 54-61.
- Arboleda, G., Huang, T. J., Waters, C., Verkhatsky, A., Fernyhough, P., Gibson, R. M. (2007). Insulin-like growth factor-1-dependent maintenance of neuronal metabolism through the phosphatidylinositol 3-kinase–Akt pathway is inhibited by C₂-ceramide in CAD cells. *European Journal of Neuroscience*, 25, 3030-3038.
- Arellano-Campos, O., Gómez-Velasco, D. V., Bello-Chavolla, O. Y., Cruz-Bautista, I., Melgarejo-Hernandez, M. A., Muñoz-Hernandez, L., Guillén, L. E., Garduño-García, J. J., Alvirde, U., Ono-Yoshikawa, Y., Choza-Romero, R., Sauque-Reyna, L., Garay-Sevilla, M.E., Malacara-Hernandez, J. M., Tusie-Luna M. T., Gutierrez-Robledo, L. M., Gómez-Pérez, F. J., Rojas, R., Aguilar-Salinas, C. A. (2019). Development and validation of a predictive model for incident type 2 diabetes in middle-aged Mexican adults: the metabolic syndrome cohort. *BMC Endocrine Disorders*, 19, 41.
- Arnold, S. E., Lucki, I., Brookshire, B. R., Carlson, G. C., Browne, C. A., Kazi, H., Sookhee, B., Bo-Ran, C., Yong, C., Mary, F., Kim, S. F. (2014). High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiology of Disease*, 67, 79-87.
- Arrang, J. M., Garbarg, M., Quach, T. T., Tuong, M. D. T., Yeramian, E., Schwartz, J. C. (1985). Actions of betahistidine at histamine receptors in the brain. *European Journal of Pharmacology*, 111, 73-84.
- Arrang, J. M., Garbarg, M., Schwartz, J. C. (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class H₃ of histamine receptor. *Nature*, 302, 832-837.

- Arshad, N., Lin, T. S., Yahaya, M. F. (2018). Metabolic syndrome and its effect on the brain: possible mechanism. *CNS and Neurological Disorders Drug Targets*, 17, 595–603.
- Avramoglu, R. K., Basciano, H., Adeli, K. (2006). Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clinica Chimica Acta*, 368, 1-19.
- Ayano, G. (2016). Dopamine: receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders: review of literatures. *Journal of Mental Disorders Treatment*, 2, 2.
- Banks, W. A., Owen, J. B., Erickson, M. A. (2012). Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacology and Therapeutics*, 136, 82-93.
- Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V., Ruiz-Albusac, J. M. (2014). Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 161.
- Bousquet, M., St-Amour, I., Vandal, M., Julien, P., Cicchetti, F., Calon, F. (2012). High-fat diet exacerbates MPTP-induced dopaminergic degeneration in mice. *Neurobiology of Disease*, 45, 529-538.
- Brandes R. P. (2010). Vascular functions of NADPH oxidases. *Hypertension*. 56, 17–21.
- Callier, S., Snapyan, M., Le Crom, S., Prou, D., Vincent, J. D., Vernier, P. (2003). Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biology of the Cell*, 95, 489-502.
- Cameron, A. J., Shaw, J. E., Zimmet, P. Z. (2004). The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 33, 351-375.

- Camps, M., Kelly, P. H., Palacios, J. M. (1990). Autoradiographic localization of dopamine D₁ and D₂ receptors in the brain of several mammalian species. *Journal of Neural Transmission/General Section*, 80, 105-127.
- Carvelli, L., Morón, J. A., Kahlig, K. M., Ferrer, J. V., Sen, N., Lechleiter, J. D., Leeb-Lundberg, L. M., Merrill, G., Lafer, E. M., Ballou, L. M., Shippenberg, T. S., Javitch, J. A., Lin, R. Z., Galli, A. (2002). PI 3-kinase regulation of dopamine uptake. *Journal of Neurochemistry*, 81, 859–869.
- Chunchai, T., Samniang, B., Sripetchwandee, J., Pintana, H., Pongkan, W., Kumfu, S., Shinlapawittayatorn, K., KenKnight, B., Chattipakorn, N., Chattipakorn S. (2016). Vagus nerve stimulation exerts the neuroprotective effects in obese-insulin resistant rats, leading to the improvement of cognitive function. *Scientific Reports*, 6, 1-11.
- Cincotta, A. H., Tozzo, E., Scislawski, P. W. (1997). Bromocriptine/SKF38393 treatment ameliorates obesity and associated metabolic dysfunctions in obese (ob/ob) mice. *Life Sciences*, 61, 951-956
- Clineschmidt, B. V., Lotti, V. J. (1973). Histamine: intraventricular injection suppresses ingestive behavior of the cat. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 206, 288-98.
- Conti, G., Blandini, F., Tassorelli, C., Giubilei, F., Fornai, F., Zocchi, A., Orzi, F. (2001). Intrastratial injection of D₁ or D₂ dopamine agonists affects glucose utilization in both the direct and indirect pathways of the rat basal ganglia. *Neuroscience Letters*, 309, 161-164.
- Cornier, M. A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. J., Stob, N. R., Van Pelt, R., Wang, H., Eckel, R. H. (2008). The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, 29, 777-822.

- Dawson, T. M., Barone, P., Sidhu, A., Wamsley, J. K., Chase, T. N. (1988). The D₁ dopamine receptor in the rat brain: Quantitative autoradiographic localization using an iodinated ligand. *Neuroscience*, 26, 83-100.
- De la Monte, S., Derdak, Z., Wands, J. R. (2012). Alcohol, insulin resistance and the liver–brain axis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27, 33-41.
- Díaz, N. F., Flores-Herrera, H., García-López, G., Molina-Hernández, A. (2019). Central Histamine, the H₃-Receptor and Obesity Therapy. *CNS and Neurological Disorders-Drug Targets*, 18, 516-522.
- Diggs-Andrews, K. A., Zhang, X., Song, Z., Daphna-Iken, D., Routh, V. H., Fisher, S. J. (2010). Brain insulin action regulates hypothalamic glucose sensing and the counterregulatory response to hypoglycemia. *Diabetes*, 59, 2271-2280.
- Dincer, U. D. (2012). Cardiac ryanodine receptor in metabolic syndrome: is JTV519 (K201) future therapy? *Diabetes, Metabolic Syndrome and obesity: targets and therapy*, 5, 89-99.
- Dodd, G. T., Tiganis, T. (2017). Insulin action in the brain: Roles in energy and glucose homeostasis. *Journal of Neuroendocrinology*, 29, e12513.
- Eckel, R. H., Alberti, K. G., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z. (2010). The metabolic syndrome. *Lancet*, 375, 181-183.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet*, 365, 1415-1428.
- Egan, B. M. (2003). Insulin resistance and the sympathetic nervous system. *Current Hypertension Reports*, 5, 247-254.
- Engin A. (2017). 'The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome', in Engin, A.B. (ed.). *Obesity and lipotoxicity*. Cham: Springer, pp. 1–17.

- Falkner, B., Cossrow, N. D. (2014). Prevalence of metabolic syndrome and obesity-associated hypertension in the racial ethnic minorities of the United States. *Current Hypertension Reports*, 16, 449.
- Feldman, D. E. (2009). Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 33-55.
- Fernández-Miranda, G., Romero-Garcia, T., Barrera-Lechuga, T. P., Mercado-Morales, M., Rueda, A. (2019). Impaired activity of ryanodine receptors contributes to calcium mishandling in cardiomyocytes of metabolic syndrome rats. *Frontiers in Physiology*, 10, 520.
- Figlewicz, D. P., Szot, P., Chavez, M., Woods, S. C., Veith, R. C. (1994). Intraventricular insulin increases dopamine transporter mRNA in rat VTA/substantia nigra. *Brain Research*, 644, 331-334.
- Floyd, R. A., Hensley, K. (2002). Oxidative stress in brain aging: implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging*, 23, 795-807.
- Freeman, A. S., Weddige, F. K., Lipinski, J. L., Jr. (2001). Effect of glucose on antipsychotic drug-induced changes in dopamine neuronal activity. *European Journal of Pharmacology*, 431, 43-46.
- Furner, R. L., Neville, E. D., Talarico, K. S., Feller, D. D. (1972). Effects of pentobarbital on plasma glucose and free fatty acids in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 139, 231-234.
- Garris, P. A., Ciolkowski, E. L., Pastore, P., Wightman, R. M. (1994). Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. *Journal of Neuroscience*, 14, 6084-6093.

- Geiger, B. M., Haburcak, M., Avena, N. M., Moyer, M. C., Hoebel, B. G., Pothos, E. N. (2009). Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity. *Neuroscience*, 159, 1193-1199.
- Ginsberg, H. N. (2000). Insulin resistance and cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 106, 453-458.
- Giovannini, M. G., Efoudebe, M., Passani, M. B., Baldi, E., Bucherelli, C., Giachi, F., Corradetti, R., Blandina, P. (2003). Improvement in fear memory by histamine-elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells. *The Journal of neuroscience*, 23, 9016–9023.
- González-Sepúlveda, M., Rosell, S., Hoffmann, H. M., del Mar Castillo-Ruiz, M., Mignon, V., Moreno-Delgado, D., Vignes, M., Díaz, J., Sabriá, J., Ortiz, J. (2013). Cellular distribution of the histamine H₃ receptor in the basal ganglia: functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission. *Basal Ganglia*, 3, 109-121.
- Grandy, D. K., Miller, G. M., Li, J. X. (2016). “TAARgeting Addiction”—the alamo bears witness to another revolution: an overview of the Plenary Symposium of the 2015. Behavior, Biology and Chemistry Conference. *Drug and Alcohol Dependence*, 159, 9-16.
- Gray, S. M., Meijer, R. I., Barrett, E. J. (2014). Insulin regulates brain function, but how does it get there?. *Diabetes*, 63, 3992-3997.
- Grillo, C. A., Piroli, G. G., Lawrence, R. C., Wrighten, S. A., Green, A. J., Wilson, S. P., Sakai, R., Kelly, S., Wilson, M., Mott, D., Reagan, L. P. (2015). Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic plasticity. *Diabetes*, 64, 3927-3936.
- Gulat-Marnay, C., Lafitte, A., Arrang, J. M., Schwartz, J. C. (1989). Modulation of histamine release and synthesis in the brain mediated by α_2 -adrenoceptors. *Journal of Neurochemistry*, 53, 519-524.

- Guo, S. (2014). Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models to disease mechanisms. *The Journal of Endocrinology*, 220, T1–T23.
- Gutiérrez-Solis, A. L., Datta Banik, S., Méndez-González, R. M. (2018). Prevalence of metabolic syndrome in Mexico: a systematic review and meta-analysis. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 16, 395-405.
- Haffner, S. M., Valdez, R. A., Hazuda, H. P., Mitchell, B. D., Morales, P. A., Stern, M. P. (1992). Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes*, 41, 715-722.
- Haller, H., Hanefeld, M. (1975). Consideración sinóptica de los factores de riesgo metabólico. *Trastornos del Metabolismo de los Lípidos*, 254-264.
- Heimer, L., Van Hoesen, G. (1979). 'Ventral striatum' in Divac, I., Öberg R. G. (ed.). *Neostriatum. Proceedings of the Workshop*. Denmark: Pergamon, pp. 147-158.
- Henry, M. B., Zheng, S., Duan, C., Patel, B., Vassileva, G., Sondey, C., Lachowicz, J., Hwa, J. J. (2011). Antidiabetic properties of the histamine H₃ receptor protean agonist proxyfan. *Endocrinology*, 152, 828-835.
- Hess, E. J., Battaglia, G., Norman, A. B., Iorio, L. C., Creese, I. (1986). Guanine nucleotide regulation of agonist interactions at [³H]SCH23390-labeled D₁ dopamine receptors in rat striatum. *European Journal of Pharmacology*, 121, 31-38.
- Hill, S. J. (1990). Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacological Reviews*, 42, 45-83.

- Hill, S., Ganellin, C. R., Timmerman, H., Schwartz, J. C., Shankley, N. P., Young, J. M., Schunack, W., Levi, R., Haas, H. L. (1997). International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 49, 253-278.
- Hirose, A., Tanikawa, T., Mori, H., Okada, Y., Tanaka, Y. (2010). Advanced glycation end products increase endothelial permeability through the RAGE/Rho signaling pathway. *FEBS Letters*, 584, 61-66.
- Hollman, G., Kristenson, M. (2008). The prevalence of the metabolic syndrome and its risk factors in a middle-aged Swedish population—Mainly a function of overweight?. *European Journal of Cardiovascular Nursing*, 7, 21-26.
- Hou, H., Wang, C., Jia, S., Hu, S., Tian, M. (2014). Brain dopaminergic system changes in drug addiction: a review of positron emission tomography findings. *Neuroscience Bulletin*, 30, 765-776.
- Hurd, Y. L., Suzuki, M., Sedvall, G. C. (2001). D₁ and D₂ dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 22, 127-137.
- Itowi, N., Nagai, K., Nakagawa, H., Watanabe, T., Wada, H. (1988). Changes in the feeding behavior of rats elicited by histamine infusion. *Physiology and Behavior*, 44, 221-226.
- Keaney Jr, J. F., Larson, M. G., Vasan, R. S., Wilson, P. W., Lipinska, I., Corey, D., Massaro, P. S., Vita, J. A., Benjamin, E. J. (2003). Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23, 434-439.
- Khang, R., Park, C., Shin, J. H. (2015). Dysregulation of parkin in the substantia nigra of db/db and high-fat diet mice. *Neuroscience*, 294, 182-192.

- Khanh, D. V., Choi, Y. H., Moh, S. H., Kinyua, A. W., Kim, K. W. (2014). Leptin and insulin signaling in dopaminergic neurons: relationship between energy balance and reward system. *Frontiers in Psychology*, 5, 846.
- Kleinridders, A., Cai, W., Cappellucci, L., Ghazarian, A., Collins, W. R., Vienberg, S. G., Photos, E. E., Kahn, C. R. (2015). Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 112, 3463-3468.
- Kleinridders, A., Ferris, H. A., Cai, W., Kahn, C. R. (2014). Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes*, 63, 2232-2243.
- Klimek, V., Nielsen, M. (1987). Chronic treatment with antidepressants decreases the number of [³H] SCH 23390 binding sites in the rat striatum and limbic system. *European Journal of Pharmacology*, 139, 163-169.
- Könner, A. C., Hess, S., Tovar, S., Mesaros, A., Sánchez-Lasheras, C., Evers, N., Verhagen, L., Bronneke, H., Kleinridders, A., Hampel, B., Kloppenburg, P. (2011). Role for insulin signaling in catecholaminergic neurons in control of energy homeostasis. *Cell Metabolism*, 13, 720-728.
- Kumar, T. P., Antony, S., Gireesh, G., George, N., Paulose, C. S. (2010). Curcumin modulates dopaminergic receptor, CREB and phospholipase C gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Biomedical Science*, 17, 43.
- Kylin E. (1923). Estudios sobre la hipertensión, hiperglucemia y síndrome de hiperuricemia. *Resultados en Medicina Interna y Pediatría*, 44:105-27.
- Lackovi, Z., Šalković, M. (1989) Streptozotocin and alloxan produce alterations in rat brain monoamines independently of pancreatic beta cells destruction. *Life Sciences*, 46:49-54.

- Laclaustra, M., Corella, D., Ordovas, J. M. (2007). Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17, 125-139.
- Landa-Galván, H. V., Ríos-Castro, E., Romero-García, T., Rueda, A., Olivares-Reyes, JA. (2020). Metabolic syndrome diminishes insulin-induced Akt activation and causes a redistribution of Akt-interacting proteins in cardiomyocytes. *Plos One*, 15, e0228115.
- Langin, D., Dicker, A., Tavernier, G., Hoffstedt, J., Mairal, A., Rydén, M., Arner, E., Sicard, A., Jenkins, C., Viguerie, N., Van Harmelen, V., Gross, R., Holm, C. Arner, P. (2005). Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes*, 54, 3190-3197.
- Lecklin, A., Tuomisto, L., MacDonald, E. (1995). Metoprine, an inhibitor of histamine N-methyltransferase but not catechol-O-methyltransferase, suppresses feeding in sated and in food deprived rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 17, 47-52.
- Lee, D., Huang, W., Lim, A. T. (2000). Dopamine induces a biphasic modulation of hypothalamic ANF neurons: a ligand concentration-dependent effect involving D₅ and D₂ receptor interaction. *Molecular Psychiatry*, 5, 39-48.
- Levin, B. E., Dunn-Meynell, A. A. (1997). Dysregulation of arcuate nucleus preproneuropeptide Y mRNA in diet-induced obese rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 272, R1365-R1370.
- Lovenberg, T. W., Roland, B. L., Wilson, S. J., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., Jackson, M. R., Erlander, M. G. (1999). Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Molecular Pharmacology*, 55, 1101-1107.

- Luque-Contreras, D., Carvajal, K., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Campos-Peña, V. (2014). Oxidative stress and metabolic syndrome: cause or consequence of Alzheimer's disease?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 497802.
- Maciejczyk, M., Żebrowska, E., Chabowski, A. (2019). Insulin resistance and oxidative stress in the brain: what's new?. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 874.
- Mancini, A. D., Poitout, V. (2015). GPR40 agonists for the treatment of type 2 diabetes: life after 'taking'a hit. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 17, 622-629.
- Mariottini, C., Scartabelli, T., Bongers, G., Arrigucci, S., Nosi, D., Leurs, R., Chiarugi, A., Blandina, P., Pellegrini-Giampietro, D. E., Passani, M. B. (2009). Activation of the histaminergic H₃ receptor induces phosphorylation of the Akt/GSK-3 β pathway in cultured cortical neurons and protects against neurotoxic insults. *Journal of Neurochemistry*, 110, 1469–1478.
- Martinez-Mir, M. I., Pollard, H., Moreau, J., Arrang, J. M., Ruat, M., Traiffort, E., Schwartz, J. C., Palacios, J. M. (1990). Three histamine receptors (H₁, H₂ and H₃) visualized in the brain of human and non-human primates. *Brain Research*, 526, 322-327.
- Martins, A. D., Majzoub, A., Agawal, A. (2019). Metabolic syndrome and male fertility. *The World Journal of Men's Health*, 37, 113-127.
- McCracken, E., Monaghan, M., Sreenivasan, S. (2018). Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology*, 36, 14-20.
- Merickel, A., Edwards, R. H. (1995). Transport of histamine by vesicular monoamine transporter-2. *Neuropharmacology*, 34, 1543-1547.

- Molina-Hernández, A., Nuñez, A., Arias-Montaño, J. A. (2000). Histamine H₃-receptor activation inhibits dopamine synthesis in rat striatum. *NeuroReport*, 11, 163-166.
- Nieto-Alamilla, G., Márquez-Gómez, R., García-Gálvez, A. M., Morales-Figueroa, G. E., Arias-Montaño, J. A. (2016). The histamine H₃ receptor: structure, pharmacology, and function. *Molecular Pharmacology*, 90, 649-673.
- Nuzzo, D., Picone, P., Baldassano, S., Caruana, L., Messina, E., Marino, A., Cappello, Francesco., Mule, F., Di Carlo, M. (2015). Insulin resistance as common molecular denominator linking obesity to Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 12, 723-735.
- Okakura-Mochizuki, K., Mochizuki, T., Yamamoto, Y., Horii, A., Yamatodani, A. (1996). Endogenous GABA modulates histamine release from the anterior hypothalamus of the rat. *Journal of Neurochemistry*, 67, 171-176.
- Okakura-Mochizuki, K., Mochizuki, T., Yamamoto, Y., Horii, A., Yamatodani, A. (1996). Endogenous GABA modulates histamine release from the anterior hypothalamus of the rat. *Journal of Neurochemistry*, 67, 171-176.
- Panchal, S. K., Brown, L. (2010). Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 351982.
- Panula, P., Chazot, P. L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W. L., Stark, H., Thurmond, R. L., Haas, H. L. (2015). International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 67, 601-655.
- Panula, P., Nuutinen, S. (2013). The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14, 472-487.

- Parks, G. S., Olivas, N. D., Ikrar, T., Sanathara, N. M., Wang, L., Wang, Z., Civelli, O., Xu, X. (2014). Histamine inhibits the melanin-concentrating hormone system: implications for sleep and arousal. *The Journal of Physiology*, 592, 2183-2196.
- Patterson, T. A., Brot, M. D., Zavosh, A., Schenk, J. O., Szot, P., Figlewicz, D. P. (1998). Food deprivation decreases mRNA and activity of the rat dopamine transporter. *Neuroendocrinology*, 68, 11-20.
- Pillot, C., Héron, A., Cochois, V., Tardivel-Lacombe, J., Ligneau, X., Schwartz, J. C., Arrang, J. M. (2002). A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. *Neuroscience*, 114, 173-193.
- Pintana, H., Sripetchwandee, J., Supakul, L., Apaijai, N., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S. (2014). Garlic extract attenuates brain mitochondrial dysfunction and cognitive deficit in obese-insulin resistant rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 39, 1373-1379.
- Pipatpiboon, N., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S. C. (2012). PPAR γ agonist improves neuronal insulin receptor function in hippocampus and brain mitochondria function in rats with insulin resistance induced by long term high-fat diets. *Endocrinology*, 153, 329-338.
- Pollard, H., Moreau, J., Arrang, J. M., Schwartz, J. C. (1993). A detailed autoradiographic mapping of histamine H₃ receptors in rat brain areas. *Neuroscience*, 52, 169-189.
- Pratchayasakul, W., Kerdphoo, S., Petsophonsakul, P., Pongchaidecha, A., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S. C. (2011). Effects of high-fat diet on insulin receptor function in rat hippocampus and the level of neuronal corticosterone. *Life Sciences*, 88, 619-627.
- Psichas, A., Larraufie, P. F., Goldspink, D. A., Gribble, F. M., Reimann, F. (2017). Chylomicrons stimulate incretin secretion in mouse and human cells. *Diabetologia*, 60, 2475–2485.

- Rada, P., Bocarsly, M. E., Barson, J. R., Hoebel, B. G., Leibowitz, S. F. (2010). Reduced accumbens dopamine in Sprague–Dawley rats prone to overeating a fat-rich diet. *Physiology and Behavior*, 101, 394-400.
- Raizada, M. K., Shemer, J., Judkins, J. H., Clarke, D. W., Masters, B. A., LeRoith, D. (1988). Insulin receptors in the brain: structural and physiological characterization. *Neurochemical Research*, 13, 297-303.
- Rapanelli, M. (2017). The magnificent two: histamine and the H₃ receptor as key modulators of striatal circuitry. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 73, 36-40.
- Raza, H., John, A., Howarth, F. C. (2015). Increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction in zucker diabetic rat liver and brain. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35, 1241-1251.
- Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37, 1595-1607.
- Reimann, F., Gribble, F. M. (2016). G protein-coupled receptors as new therapeutic targets for type 2 diabetes. *Diabetologia*, 59, 229-233.
- Reinheimer, T., Baumgartner, D., Hohle, K. D., Racke, K., Wessler, I. (1997). Acetylcholine via muscarinic receptors inhibits histamine release from human isolated bronchi. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156, 389-395.
- Reinheimer, T., Mohlig, T., Zimmermann, S., Hohle, K. D., Wessler, I. (2000). Muscarinic control of histamine release from airways: inhibitory M₁-receptors in human bronchi but absence in rat trachea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162, 534-538.

- Reno, C. M., Puente, E. C., Sheng, Z., Daphna-Iken, D., Bree, A. J., Routh, V. H., Kahn, B. B., Fisher, S. J. (2017). Brain GLUT4 knockout mice have impaired glucose tolerance, decreased insulin sensitivity, and impaired hypoglycemic counterregulation. *Diabetes*, 66, 587-597.
- Réus, G. Z., dos Santos, M. A. B., Abelaira, H. M., Titus, S. E., Carlessi, A. S., Matias, B. I., Bruchchen, L., Florentino, D., Vieira, A., Petronilho, F., Ceretta, L. B., Zugno, A. I., Quevedo, J. (2016). Antioxidant treatment ameliorates experimental diabetes-induced depressive-like behaviour and reduces oxidative stress in brain and pancreas. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32, 278-288.
- Rieusset, J., Bouzakri, K., Chevillotte, E., Ricard, N., Jacquet, D., Bastard, J. P., Laville, M., Vidal, H. (2004). Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 53, 2232-2241.
- Robinson, R., Krishnakumar, A., Paulose, C. S. (2009). Enhanced dopamine D₁ and D₂ receptor gene expression in the hippocampus of hypoglycaemic and diabetic rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29, 365-372.
- Rohilla, A., Ali, S. (2012). Alloxan induced diabetes: mechanisms and effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3, 819-823.
- Šalković, M., Lacković, Z. (1992). Brain D₁ dopamine receptor in alloxan-induced diabetes. *Diabetes*, 41, 1119-1121.
- Šalković, M., Sabolić, I., Lacković, Z. (1995). Striatal dopaminergic D₁ and D₂ receptors after intracerebroventricular application of alloxan and streptozocin in rat. *Journal of Neural Transmission. General Section*, 100, 137-145.

- Sallmen, T., Lozada, A. F., Anichtchik, O. V., Beckman, A. L., Panula, P. (2003). Increased brain histamine H₃ receptor expression during hibernation in golden-mantled ground squirrels. *BMC Neuroscience*, 4, 24.
- Sánchez-Lemus, E., Arias-Montaña, J. A. (2004). Histamine H₃ receptor activation inhibits dopamine D₁ receptor-induced cAMP accumulation in rat striatal slices. *Neuroscience Letters*, 364, 179-184.
- Sa-nguanmoo, P., Tanajak, P., Kerdphoo, S., Satjaritanun, P., Wang, X., Liang, G., Xiaokun, L., Jiang, C., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S. C. (2016). FGF21 improves cognition by restored synaptic plasticity, dendritic spine density, brain mitochondrial function and cell apoptosis in obese-insulin resistant male rats. *Hormones and Behavior*, 85, 86-95.
- Sartorius, T., Peter, A., Schulz, N., Drescher, A., Bergheim, I., Machann, J., Schick, F., Siegel-Axel, D., Schürmann, A., Weigert, C., Hennige, A., Häring, H. U. (2014). Cinnamon extract improves insulin sensitivity in the brain and lowers liver fat in mouse models of obesity. *Plos One*, 9, e92358.
- Scherer, T., O'Hare, J., Diggs-Andrews, K., Schweiger, M., Cheng, B., Lindtner, C., Ziellinski, E., Vempati, P., Su, K., Dighe, S., Milsom, T., Puchowicz, M., Scheja, L., Zechner, R., Fisher, S., Previs, S., Buettner, C. (2011). Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. *Cell Metabolism*, 13, 183-194.
- Schlicker, E., Kathmann, M. (2017). 'Role of the Histamine H₃ Receptor in the Central Nervous System' in Hattori, Y., Seifert, R. (au.). *Histamine and histamine receptors in health and disease*. Cham: Springer, pp. 280-285.
- Schwartz, J. C., Arrang, J. M., Garbarg, M., Pollard, H., Ruat, M. (1991). Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiological Reviews*, 71, 1-51.
- Schwartz, J. C., Lampart, C., Rose, C. (1972). Histamine formation in rat brain in vivo: effects of histidine loads. *Journal of Neurochemistry*, 19, 801-810.

- Sena, C. M., Pereira, A. M., Seïça, R. (2013). Endothelial dysfunction—a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832, 2216-2231.
- Smythies, J. (2005). Section II. The dopamine system. *International Review of Neurobiology*, 64, 123-172.
- Soares-Cunha, C., de Vasconcelos, N. A., Coimbra, B., Domingues, A. V., Silva, J. M., Loureiro-Campos, Gaspar, R., Sotiropoulos, L., Sousa, N., Rodrigues, A. J. (2019). Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion. *Molecular Psychiatry*, 1,15.
- Song, I., Huganir, R. L. (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 25, 578-588.
- Song, J., Salek-Ardakani, S., Rogers, P. R., Cheng, M., Van Parijs, L., Croft, M. (2004). The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity. *Nature Immunology*, 5, 150–158.
- Sripetchwandee, J., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S. C. (2018). Links between obesity-induced brain insulin resistance, brain mitochondrial dysfunction, and dementia. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 496.
- Stice, E., Yokum, S., Zald, D., Dagher, A. (2010). 'Dopamine-based reward circuitry responsivity, genetics, and overeating' in Adan, R.A., Kaye, W.H. (ed.). *Behavioral neurobiology of eating disorders*. Berlin: Springer, (pp. 81-93).
- Stockhorst, U., de Fries, D., Steingrueber, H. J., Scherbaum, W. A. (2004). Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiology and Behavior*, 83, 47-54.

- Takahashi, K., Suwa, H., Ishikawa, T., Kotani, H. (2002). Targeted disruption of H₃ receptors results in changes in brain histamine tone leading to an obese phenotype. *The Journal of Clinical Investigation*, 110, 1791-1799.
- Tardivel-Lacombe, J., Morisset, S., Gbahou, F., Schwartz, J. C., Arrang, J. M. (2001). Chromosomal mapping and organization of the human histamine H₃ receptor gene. *Neuroreport*, 12, 321-324.
- Terry, P., Gilbert, D. B., Cooper, S. J. (1995). Dopamine receptor subtype agonists and feeding behavior. *Obesity Research*, 3, 515S-523S.
- Tong, M., De la Monte, S. M. (2009). Mechanisms of ceramide-mediated neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, 16, 705-714.
- Tuomisto, L., Yamatodani, A., Jolkkonen, J., Sainio, E. L., Airaksinen, M. M. (1994). Inhibition of brain histamine synthesis increases food intake and attenuates vasopressin response to salt loading in rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 16, 355-359.
- Undieh, A. S. (2010). Pharmacology of signaling induced by dopamine D₁-like receptor activation. *Pharmacology and Therapeutics*, 128, 37-60.
- Vague, J. (1947). Sexual differentiation, a factor affecting the forms of obesity. *La Presse Médicale*, 30, 339-340.
- Vallone, D., Picetti, R., Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24, 125-132.
- Van der Plasse, G., Van Zessen, R., Luijendijk, M. C. M., Erkan, H., Stuber, G. D., Ramakers, G. M. J., Adan, R. A. H. (2015). Modulation of cue-induced firing of ventral tegmental area dopamine neurons by leptin and ghrelin. *International Journal of Obesity*, 39, 1742-1749.

- Van der Werf, J. F., Bast, A., Bijloo, G. J., Van der Vliet, A., Timmerman, H. (1987). HA autoreceptor assay with superfused slices of rat brain cortex and electrical stimulation. *European Journal of Pharmacology*, 138, 199-206.
- Vannucci, S. J., Koehler-Stec, E. M., Li, K., Reynolds, T. H., Clark, R., Simpson, I. A. (1998). GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Research*, 797, 1-11.
- Vaziri, P., Dang, K., Anderson, G. H. (1997). Evidence for histamine involvement in the effect of histidine loads on food and water intake in rats. *The Journal of Nutrition*, 127, 1519-1526.
- Verdiere, M., Rose, C., Schwartz, J. C. (1975). Synthesis and release of histamine studied on slices from rat hypothalamus. *European Journal of Pharmacology*, 34, 157-168.
- Wada, H., Inagaki, N., Yamatodani, A., Watanabe, T. (1991). Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity?. *Trends in Neurosciences*, 14, 415-418.
- Walther, G., Obert, P., Dutheil, F., Chapier, R., Lesourd, B., Naughton, G., Courteix, D., Vinet, A. (2015). Metabolic syndrome individuals with and without type 2 diabetes mellitus present generalized vascular dysfunction: cross-sectional study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35, 1022-1029.
- Wang, D., Yan, J., Chen, J., Wu, W., Zhu, X., Wang, Y. (2015). Naringin improves neuronal insulin signaling, brain mitochondrial function, and cognitive function in high-fat diet-induced obese mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35, 1061-1071.

- Wang, G. J., Volkow, N. D., Logan, J., Pappas, N. R., Wong, C. T., Zhu, W., Netusil, N., Fowler, J. S. (2001). Brain dopamine and obesity. *Lancet*, 357, 354-357.
- Wei, Y., Williams, J. M., Dipace, C., Sung, U., Javitch, J. A., Galli, A., Saunders, C. (2007). Dopamine transporter activity mediates amphetamine-induced inhibition of Akt through a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II-dependent mechanism. *Molecular Pharmacology*, 71, 835-842.
- Wu, Z., Yu, Y., Wu, Y., Patch, C., Szabo, A., Huang, X. F. (2013). Reduction of histamine H₁ receptor binding induced by high-fat diet can be prevented by DHA and dietary fiber in specific brain areas of male rats. *Brain Research Bulletin*, 97, 119-125.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J., Tarataglia, L., Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 112, 1821-1830.
- Yeh, W. C., Tsao, Y. C., Li, W. C., Tzeng, I. S., Chen, L. S., Chen, J. Y. (2019). Elevated triglyceride-to-HDL cholesterol ratio is an indicator for insulin resistance in middle-aged and elderly Taiwanese population: a cross-sectional study. *Lipids in Health and Disease*, 18, 176.
- Yoshimoto, R., Miyamoto, Y., Shimamura, K., Ishihara, A., Takahashi, K., Kotani, H., Chen, A. S., Chen, H. Y., Macneil, D. J., Katani, A., Tokita, S. (2006). Therapeutic potential of histamine H₃ receptor agonist for the treatment of obesity and diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 13866-13871.

Zhao, W. Q., Alkon, D. L. (2001). Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 177, 125-134.