



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DISTRIBUCIÓN DIFERENCIAL DE LOS RECEPTORES 1 Y 2 DE ADIPONECTINA
EN EL BULBO OLFATORIO E HIPOCAMPO DE LA RATA: MODULACIÓN DE LA
ADIPONECTINA SOBRE EL CONTENIDO DEL RECEPTOR CEREBRAL DE
INSULINA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MIRANDA MARTÍNEZ ALFREDO

TUTORA: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, CD. MX. MAYO 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DISTRIBUCIÓN DIFERENCIAL DE LOS RECEPTORES 1 Y 2 DE ADIPONECTINA
EN EL BULBO OLFATORIO E HIPOCAMPO DE LA RATA: MODULACIÓN DE LA
ADIPONECTINA SOBRE EL CONTENIDO DEL RECEPTOR CEREBRAL DE
INSULINA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MIRANDA MARTÍNEZ ALFREDO

TUTORA: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM

MÉXICO, CD. MX. MAYO 2018




Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 12 de marzo de 2018, aprobó la ratificación del jurado que fue asignado en la reunión del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 22 de agosto de 2016, para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **MIRANDA MARTÍNEZ ALFREDO**, con número de cuenta **89241305**, con la tesis titulada **"DISTRIBUCIÓN DIFERENCIAL DE LOS RECEPTORES 1 Y 2 DE ADIPONECTINA EN EL BULBO OLFATORIO E HIPOCAMPO DE LA RATA: MODULACIÓN DE LA ADIPONECTINA SOBRE EL CONTENIDO DEL RECEPTOR CEREBRAL DE INSULINA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN**:

Presidente: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Secretario: DRA. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA
Suplente: DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA
Suplente: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 12 de abril de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, a su Coordinación de Estudios de Posgrado y al Posgrado en Ciencias Biológicas.

Este trabajo fue financiado parcialmente con los apoyos SDEI.PTID.05.5, CONACyT 24784-M, CONACyT 118673, CONACyT 48630, PAPIIT IN216907, PAPIIT IN200110-3, CONACyT 152613, PAPIIT IN211913-3 y la beca del CONACyT No. 385286.

A mi comité tutorial compuesto por Dras. Yolanda López Vidal, Marta Alicia Menjivar Iraheta y Rosalinda Guevara Guzmán.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Yolanda López Vidal por todo el apoyo que me brindó; la admiro por su trabajo, su empeño y por su enorme calidad humana.

Le agradezco a la Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta por aceptar ser parte de éste comité tutorial, por sus consejos y por sus atenciones; es ud. un ejemplo a seguir.

Gracias a la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán por todas las situaciones que nos tocó compartir.

A la Dra. María de la Luz Navarro Angulo, Dr. Luis Felipe Jiménez García y al Dr. Christian Humberto Guerra Araiza por aceptar leer este trabajo.

A la Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia, por su ayuda y por estar cerca de mí en un momento muy incierto. Al final de ésta travesía me quedo con sus enseñanzas de vida, esas tienen para mí un valor por encima de la actividad científica.

Mi agradecimiento más grande al Dr. Octavio Mercado Gómez por su amistad, por compartirme de sus conocimientos y su invaluable aportación para este trabajo. Un honor trabajar a su lado.

A la Dra. Erika Rodríguez Martínez, por su amistad. Ahora entiendo que lo más valioso lo tenemos en casa. Gracias.

A la Sra. Virginia Idalia Barrios Moreno y a la Sra. Magdalena Herrera Palomo, por todas las charlas, las risas y la ayuda, hacer antesala siempre fue divertido.

Sra. Lilia Jiménez Solís, es usted un ejemplo de fortaleza ante la vida; su calidez y entusiasmo se contagian. Muchas gracias por todo. Mi aprecio y mi admiración por siempre.

A todo el personal técnico, administrativo y a los muchos alumnos del Laboratorio Sensorial con quienes coincidí. Este trabajo solo puede entenderse a través de sus múltiples charlas, discusiones, enseñanzas y colaboraciones. Muchas gracias.

Al personal técnico y administrativo de la Facultad de Medicina y en particular a la gente del Departamento de Fisiología.

A Rocío Chávez Trejo y Erika Rodríguez Reyes, sin ustedes serían más complicados los engorrosos y rebuscados trámites dentro de la Unidad del Posgrado. Gracias por su paciencia y ayuda.

María Ruíz Luna, sin tu apoyo nada de esto podría ser posible. Gracias a ti y a los tuyos.

Alejandro García Reséndiz, no puedes faltar en ésta lista. Gracias por tanto.

A mis amigos.

A mis familiares.

A Gabriel

A mis raíces

A mis alas

A ti, por 28 razones

Índice

Página

Índice de figuras

Tablas

Abreviaturas

1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	5
3.1. Adiponectina	5
3.1.1. Características de la adiponectina	5
3.1.2. Receptores de adiponectina: AdipoR´s	7
3.1.3. Actividad periférica de la adiponectina	9
3.1.3.1. Actividad hipoglucemiante de la adiponectina	9
3.1.3.2. Inflamación	12
3.1.3.3. Aterosclerosis	12
3.1.3.4. Apoptosis	13
3.1.4. La adiponectina en el Sistema Nervioso Central	14
3.1.4.1. Adiponectina en el cerebro	14
3.1.4.2. AdipoR´s en el cerebro	15
3.1.4.3. La adiponectina regula la ingesta de alimento	15
3.1.4.4. Respuesta olfatoria	16
3.1.4.5. Proliferación celular	17
3.1.4.6. Neuroprotección	17
3.1.4.7. Enfermedad Tipo Alzheimer	18
3.1.4.8. Apoptosis	19
3.1.4.9. Actividad proinflamatoria y proapoptótica de la adiponectina en SNC	20
3.2. Insulina	21
3.2.1. Generalidades de la Insulina	21
3.2.2. El receptor de insulina	21
3.2.3. Señalización de la insulina	22
3.2.4. Actividad de la insulina en tejidos periféricos	23
3.2.5. Actividad de la insulina en el Sistema Nervioso Central	26
3.2.5.1. Control de homeostasis de energía	26
3.2.5.2. Aprendizaje y memoria	27
3.2.5.3. Supervivencia neuronal	29

3.2.5.4. Relación entre la insulina, su receptor y las enfermedades neurodegenerativas: enfermedad Tipo Alzheimer	30
3.3. Bulbos Olfatorios	33
3.4. Hipocampo	36
4. Planteamiento del problema	40
5. Hipótesis	41
6. Objetivos	41
6.1. Objetivo general	41
6.2. Objetivos particulares	41
7. Metodología	42
7.1. Animales	42
7.2. Determinación de la dosis para los tratamientos con adiponectina	42
7.3. Inyecciones de adiponectina en bulbo olfatorio e hipocampo	42
7.4. Inmunofluorescencia para AdipoR1, AdipoR2 e InsR	43
7.5. Extracción de proteínas y Western Blot	44
7.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	45
7.7. Análisis estadístico	46
8. Resultados	47
8.1. AdipoR1 y AdipoR2 se expresan en el bulbo olfatorio de la rata	47
8.2. AdipoR1 y AdipoR2 se expresan en el hipocampo de la rata	50
8.3. Determinación de la dosis para los tratamientos con adiponectina	53
8.4. Efecto de la inyección de adiponectina en bulbo olfatorio sobre el contenido del InsR en bulbo olfatorio e hipocampo	53
8.5. Efecto de la inyección de adiponectina en hipocampo sobre el contenido del InsR de bulbo olfatorio	55
8.6. Efecto de la inyección de adiponectina en hipocampo sobre el contenido del InsR de hipocampo	58
9. Discusión	60
10. Conclusiones	67
11. Literatura citada	68
12. Anexo: Artículo requisito	81

Índice de figuras

- Fig 1. Esquema de un monómero de adiponectina
- Fig 2. Esquema de diferentes formas de oligomerización de la adiponectina
- Fig 3. Esquema de los receptores de adiponectina: AdipoR1 y AdipoR2
- Fig 4. Esquema de mecanismos celulares que se activan por acción de la adiponectina en músculo esquelético e hígado
- Fig 5. Esquema de diferentes vías de señalización que modula la insulina en músculo esquelético
- Fig 6. Esquema de la participación de la insulina en la transmisión sináptica
- Fig 7. Esquema de ubicación de los bulbos olfatorios en el cerebro del humano y de la rata
- Fig 8. Esquema de ubicación del hipocampo en el cerebro del humano y de la rata
- Fig 9. Imágenes del AdipoR1 en el bulbo olfatorio de la rata
- Fig 10. Imágenes del AdipoR2 en el bulbo olfatorio de la rata
- Fig 11. Imágenes representativas de PCR, Western Blot y cuantificación de los AdipoR's en el bulbo olfatorio de la rata
- Fig 12. Imágenes del AdipoR1 en el hipocampo de la rata
- Fig 13. Imágenes del AdipoR2 en el hipocampo de la rata
- Fig 14. Imágenes representativas de PCR, Western Blot y cuantificación de los AdipoR's en el hipocampo de la rata
- Fig 15. Imágenes de los AdipoR's en el hipotálamo de la rata
- Fig 16. Imagen representativa de Western Blot de la determinación dosis-respuesta para los tratamientos con adiponectina
- Fig 17. Imagen del bulbo olfatorio indicando el sitio de inyección de los tratamientos
- Fig 18. Imagen representativa de Western Blot y cuantificación del InsR en bulbo olfatorio e hipocampo después de los tratamientos en bulbo olfatorio
- Fig 19. Imagen del hipocampo indicando el sitio de inyección de los tratamientos
- Fig 20. Imagen representativa de Western Blot del InsR en bulbo olfatorio e hipocampo después de los tratamientos en hipocampo
- Fig 21. Inmunofluorescencia del InsR en bulbo olfatorio después de los tratamientos con adiponectina en hipocampo
- Fig 22. Imagen representativa de Western Blot del InsR en hipocampo después de los tratamientos en hipocampo
- Fig 23. Inmunofluorescencia del InsR en hipocampo después de los tratamientos con adiponectina en hipocampo
- Fig 24. Esquemas de diferentes tipos de sinapsis en el bulbo olfatorio

Tablas

Tabla 1. Comparativo de señales orexigénicas, anorexigénicas y sus receptores en estructuras olfatorias y el hipotálamo.

Tabla 2. Efecto sobre la conducta alimentaria, neurogénesis y funciones cognitivas de algunos péptidos relacionados con ingesta de alimentos y que actúan sobre el hipocampo.

Lista de Abreviaturas

A-CoA	Acetil coenzima A
Acil CoA	Acil coenzima A
AdipoR's	Receptores de adiponectina
AdipoR1	Receptor 1 de adiponectina
AdipoR1 ^{-/-}	Ratones KO para el AdipoR1
AdipoR2	Receptor 2 de adiponectina
AdipoR2 ^{-/-}	Ratones KO para el AdipoR2
AgRP	Proteína relacionada con Agouti
Akt	Proteína cinasa B
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPK	Cinasa dependiente de AMP
APP	Proteína precursora de amiloide
APPL1	Proteína adaptadora-fosfotirosina que interactúa con el dominio PH-cremallera de leucina 1
CA1	Cuerno de Amón 1
CA2	Cuerno de Amón 2
CA3	Cuerno de Amón 3
CART	Transcrito relacionado con cocaína y anfetamina
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CREB	Elementos de respuesta a AMP cíclico
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Enfermedad tipo Alzheimer
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ERK 1/2	Cinasas reguladas por señales extracelulares 1/2
FoxO	Factores de transcripción Forkhead box O
G-6Pase	Glucosa 6 fosfatasa
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
GC	Células granulosas
GLUT's	Transportadores de glucosa
GLUT4	Transportador de glucosa 4
GSK3 β	Glucógeno sintasa cinasa 3 beta
HMW	Peso molecular alto
hNSCs	Células madre hipocampales
ICAM1	Molécula de adhesión intracelular 1
ICV	Intracerebroventricular
IDE	Enzima degradadora de insulina
IFN γ	Interferón gama

IGF-1R	Receptor del factor de crecimiento tipo insulínico tipo 1
IgG	Inmunoglobulina G
IKK	Cinasa IκB
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de masa corporal
InsR	Receptor de insulina
IP	Intraperitoneal
IREs	Elementos de respuesta a insulina
IRS's	Sustratos del receptor de Insulina
IV	Intravenosa
KA	Ácido kaínico
KDa	Kilodaltones
kg	Kilogramos
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LHIPP	Hipocampo izquierdo
LMW	Peso molecular bajo
LOB	Bulbo olfatorio izquierdo
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
LXR	Receptor X hepático
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MC	Células mitrales
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
mg	Miligramos
MMP9	Metaloproteasa 9
MMW	Peso molecular medio
MPO	Mieloperoxidasa
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridinio
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSH	Hormona estimulante de melanocitos
mTOR	Proteína objetivo de la rapamicina en mamíferos
NFT	Marañas neurofibrilares
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
ng	Nanogramos
NIRKO	Ratones KO del InsR neuronal
nm	Nanómetros

NMDA	N-metil-D-aspartato
NOM	Norma Oficial Mexicana
NPY	Neuropéptido Y
p38MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos p38
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinas
PGC	Células periglomerulares
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PLC	Fosfolipasa C
POMC	Pro-opiomelanocortina
PPAR α	Receptores alfa activados por proliferadores de peroxisomas
PVDF	Polivinilfluoridona
RHIP	Hipocampo derecho
RI	Resistencia a insulina
RIPA	Ensayo de radio Inmunoprecipitación
RNA	Ácido ribonucleico
ROB	Bulbo olfatorio derecho
rpm	Revoluciones por minuto
Shc-2	Proteína que contiene dominio de sarcoma-2
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida con SDS
SEM	Error estándar de la media
SM	Síndrome metabólico
SNC	Sistema Nervioso Central
SRE	Elementos de respuesta a esteroides
SREBP	Proteínas de unión a los SRE
Sw-APP	Mutación sueca de la proteína precursora del amiloide
TBST	Solución salina tamponada con Tris y Tween-20
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
UCPs	Proteínas desacoplantes
UCP-1	Proteína desacoplante 1
V	Volts
VCAM1	Molécula de adhesión vascular 1
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
β A	Beta amiloide
β A40	Beta amiloide de 40 aminoácidos
β A42	Beta amiloide de 42 aminoácidos
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros

1. Resumen

En este trabajo demostramos la presencia y distribución por grupo celular de los receptores de adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2) en el bulbo olfatorio y en el hipocampo de la rata. También se estudió el efecto de la inyección de adiponectina sobre el contenido del receptor de la insulina en las mismas regiones.

En el bulbo olfatorio, el AdipoR1 se encuentra en la capa de células periglomerulares y granulosas, aunque se observó inmunofluorescencia en la capa de células mitrales, mientras que el AdipoR2 se encontró principalmente en la capa de células mitrales.

En el hipocampo, el AdipoR1 se localiza en la capa de células piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 así como en la capa de células granulares del giro dentado, mientras que las células AdipoR2 se encontraron principalmente en este último.

El análisis por PCR confirma que los transcritos presentes en bulbo olfatorio y el hipocampo corresponden a los descritos para el AdipoR1 en el músculo esquelético y para el AdipoR2 en el hígado. Mediante los ensayos de Western Blot se pudieron corroborar estos resultados.

Con respecto al contenido del receptor de insulina, después de los tratamientos con adiponectina, no se observaron cambios significativos sobre la cantidad del receptor de insulina en el bulbo olfatorio ni en el hipocampo cuando la adiponectina se inyectó en el propio bulbo olfatorio. Por otro lado, cuando la adiponectina se inyectó en el hipocampo se observó un aumento significativo del contenido del receptor de insulina dentro del bulbo olfatorio, en comparación con

el de los animales control, mientras que en el contenido del receptor de insulina del propio hipocampo se pudo ver solo un ligero aumento. Estos datos apuntan a una posible función moduladora de la adiponectina sobre el contenido del receptor de insulina en bulbo olfatorio e hipocampo de la rata, regiones cerebrales que están relacionados con funciones olfatorias y de memoria.

2. Abstract

In this work we demonstrate the presence and distribution by cell group of adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in the olfactory bulb and hippocampus of the rat. The effect of adiponectin injection on the content of the insulin receptor in the same regions was also studied.

In the olfactory bulb, AdipoR1 is found in the periglomerular and granular cell layer, although immunofluorescence was observed in the mitral cell layer, whereas AdipoR2 was found mainly in the mitral cell layer.

In the hippocampus, AdipoR1 is located in the pyramidal cell layer of the CA1, CA2 and CA3 regions as well as in the granular cell layer of the dentate gyrus, while AdipoR2 cells were found mainly in the latter.

The PCR analysis confirms that the transcripts present in the olfactory bulb and the hippocampus correspond to those described for AdipoR1 in skeletal muscle and for AdipoR2 in the liver. By means of the Western Blot assays, these results could be corroborated.

With respect to the content of the insulin receptor, after the adiponectin treatments, no significant changes were observed in the amount of the insulin receptor in the olfactory bulb or in the hippocampus when the adiponectin was injected into the olfactory bulb itself. On the other hand, when the adiponectin was injected into the hippocampus, a significant increase in the content of the insulin receptor was observed within the olfactory bulb, in comparison with that of the control animals, while in the content of the insulin receptor of the hippocampus itself it was possible to see only a slight increase. These data point to a possible modulating function of adiponectin on the content of the insulin receptor in the olfactory bulb and

hippocampus of the rat, brain regions that are related to olfactory and memory functions.

3. Introducción

3.1 Adiponectina

3.1.1 Características de la adiponectina

La adiponectina es una citocina que fue identificada de forma independiente por cuatro grupos diferentes de investigación (Scherer et al., 1995; Maeda et al., 1996; Hu et al., 1996; Nakano et al., 1996). Inicialmente se reportó que la adiponectina era producida exclusivamente por el tejido adiposo, por lo que fue agrupada dentro de las *adipocinas*, sin embargo, se ha demostrado que se sintetiza en otros tejidos, como los osteoblastos humanos y murinos, células hepáticas, miocitos, células epiteliales y tejido placentario (Thundyil et al., 2012). La adiponectina es una proteína cuyo monómero es de aproximadamente 30kDa (Elisondo et al., 2008), está compuesta de 247 aminoácidos y consta de cuatro dominios estructurales: un dominio secuencia amino terminal, una región variable, un dominio colágeno y un dominio globular carboxilo terminal (Chandran et al., 2003) (Figura 1).

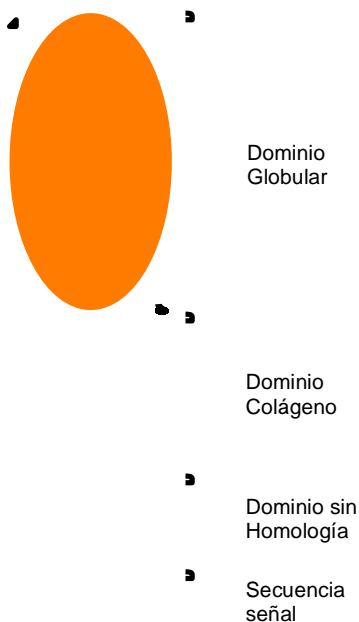


Fig. 1. Representación esquemática de un monómero de adiponectina. Tiene un dominio globular en el extremo C-terminal, un dominio colágeno, un dominio sin homología y el péptido señal en el extremo N-terminal.

Después de ser sintetizada, la adiponectina es sometida a una serie de hidroxilaciones y glicosilaciones que son esenciales para su actividad biológica (Palomer et al., 2005). La unidad funcional básica de la adiponectina está formada por asociación de tres monómeros. Los monómeros solo se limitan al adipocito y no se han visto circulando en plasma (Chandran et al., 2003). Además de los trímeros, existen en circulación agregados de seis, doce y dieciocho unidades denominados de bajo peso molecular (LMW), de peso molecular medio (MMW) y de alto peso molecular (HMW) respectivamente. Se han detectado trímeros circulantes compuestos únicamente por el dominio globular, producto de la proteólisis de los trímeros de forma completa (Figura 2). Estos trímeros presentan actividad biológica tan eficiente como los trímeros completos para disminuir el nivel sérico de glucosa y ácidos grasos (Elisondo et al., 2008).

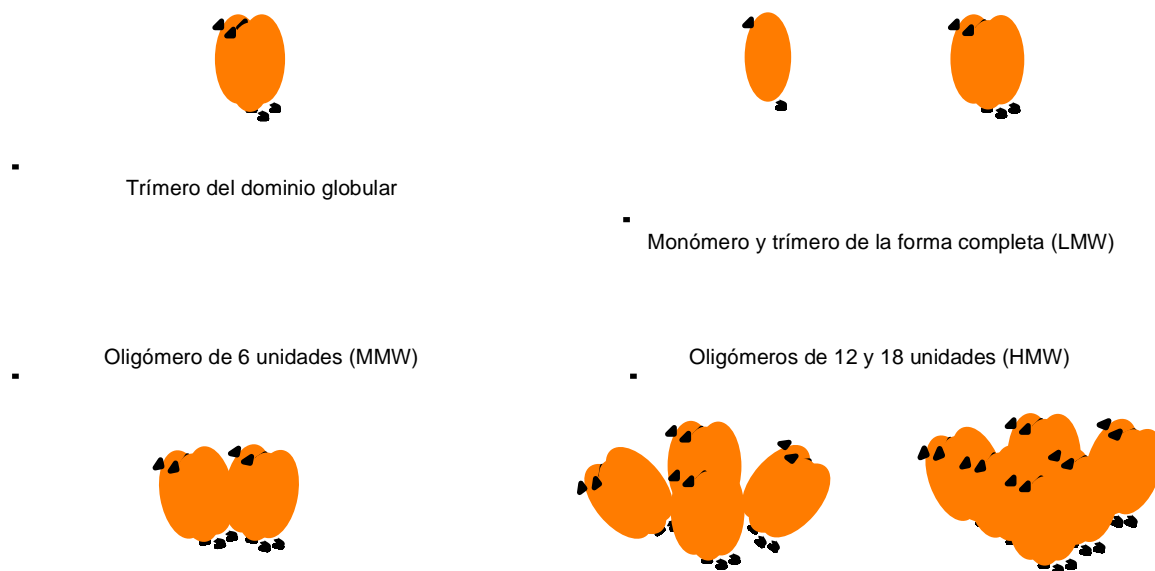


Fig. 2. Representación esquemática de diferentes formas de oligomerización de la adiponectina.

La regulación de la expresión y secreción de adiponectina hacia la circulación no está bien entendida. Las mujeres tienen niveles más altos de adiponectina que los hombres; además, las cantidades de adiponectina circulante son modificadas por factores hormonales, nutricionales, farmacológicos, citocinas circulantes, condiciones inflamatorias y estados patológicos; también influyen el ritmo circadiano, los estados de alimentación, los niveles de ácidos grasos libres, la cantidad de insulina circulante, el ejercicio y la edad de los individuos (Thundyil et al., 2012).

3.1.2 Receptores de adiponectina: AdipoR's

La actividad de la adiponectina tiene lugar después de la unión de la molécula a sus receptores (AdipoR1-AdipoR2), que son proteínas de siete dominios transmembranales (Kadowaki y Yamauchi, 2005). Se sabe que el AdipoR1 es abundante en el músculo esquelético mientras que el AdipoR2 lo es en el hígado y son considerados como los principales órganos diana de la adiponectina en la periferia; se ha descrito que ambos receptores se encuentran en el corazón, tejido adiposo, osteoblastos, páncreas, leucocitos y el cerebro de humanos, roedores y otros mamíferos (Figura 3) (Thundyil et al., 2012).

Se sabe que la T-cadherina es una proteína que tiene la capacidad de unirse a las formas hexaméricas y de alto peso molecular de la adiponectina y está presente en corazón, músculo esquelético y en los endotelios (Hug et al., 2004). Como la T-cadherina carece de dominios citoplasmáticos, no funciona como un receptor clásico que se une a su ligando e inicia una cascada de señalización intracelular. Al parecer, la función de la T-cadherina en los tejidos donde se encuentra, es

unirse a las formas de alto peso molecular de la adiponectina y favorecer la unión de ésta con sus receptores. Esta función adquiere relevancia al verse que en ratones deficientes de T-cadherina la adiponectina se acumula en el plasma por arriba de cuatro veces el nivel normal fisiológico (Parker-Duffen et al., 2013).

La expresión y síntesis de los AdipoR's dependen de los mismos factores que influyen en la expresión de la adiponectina. Se ha visto que la expresión de éstos receptores se incrementa por la activación del receptor X del hígado (LXR), los receptores alfa activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR- α) y por tratamientos con metformina y fibratos (Thundyil et al., 2012).

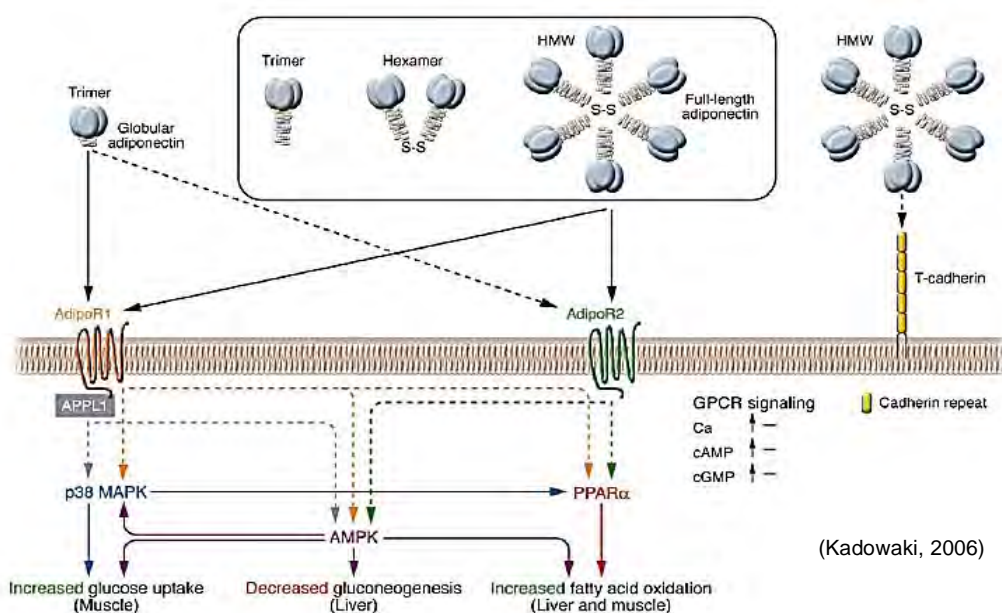


Figura 3. Esquema de los receptores de adiponectina AdipoR1 y AdipoR2, entre ellos presentan un 66,7% de identidad en los aminoácidos. Contienen 7 dominios transmembranales. La afinidad de la adiponectina por sus receptores y la T-cadherina depende de las formas en las que se encuentran organizados los oligómeros.

3.1.3 Actividad periférica de la adiponectina

3.1.3.1 Actividad hipoglucemiante de la adiponectina

La adiponectina provoca diferentes respuestas celulares a través de la proteína adaptadora-fosfotirosina que interactúa con el dominio PH-cremallera de leucina 1 (APPL1) que es mediadora de las vías de señalización entre adiponectina e insulina, uniéndose directamente con los sustratos del receptor de insulina (IRSs). Tras la activación, los IRSs sirven como plataforma de acoplamiento para la activación de la vía PI3K-Akt y la señalización hacia el interior de la célula (Achari, 2017)(Figura 3).

La adiponectina aumenta la captación de glucosa de una forma eficiente en el músculo esquelético. Se ha observado que a través de la APPL1 activa a la p38MAPK y la Rab5, derivando en una mayor translocación del transportador 4 de glucosa (GLUT4) hacia la membrana celular, favoreciendo la captación de glucosa y la reducción de sus niveles circulantes (Berg et al., 2001; Chandran et al., 2003)(Figura 3).

Por el contrario, la disminución plasmática de adiponectina está relacionada con una menor fosforilación del receptor de insulina (InsR) en músculo esquelético (Stefan et al., 2002), lo que se asocia con estados de resistencia a insulina e hiperinsulinemia y, como consecuencia, un incremento de la glucosa plasmática.

Se ha visto que la adiponectina también participa en el control glicémico disminuyendo en el hígado la expresión de la fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK) y de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pase), enzimas que participan en la

gluconeogénesis y tienen un papel fundamental en el incremento de los niveles de glucosa en la sangre en estados de ayuno (Combs et al., 2001).

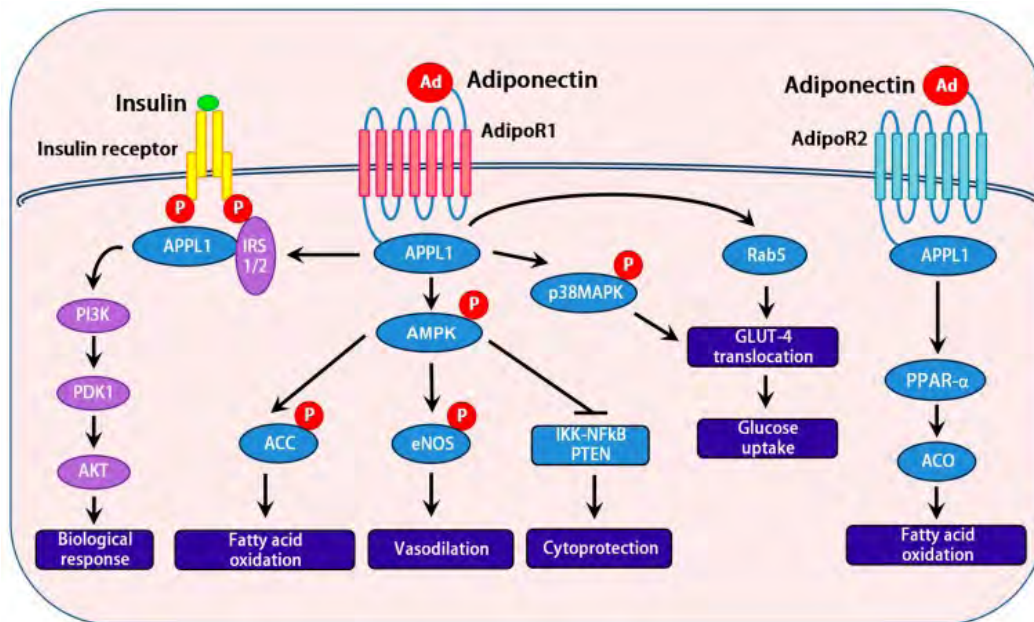


Figura 4. Representación de los mecanismos celulares que se activan por acción de la adiponectina en músculo esquelético e hígado. La APPL1 interactúa con los ISRs activando la vía de PI3K/Akt, lo que resulta en un aumento de la síntesis de proteínas, la captación y utilización de la glucosa, la síntesis de glucógeno y la reducción de la lipólisis y la gluconeogénesis. Mediante la activación de la p38MAPK y Rab5 hay un incremento en la captación de glucosa circulante. APPL1 activa los PPAR- α que tienen un papel importante en el metabolismo de lípidos. En conjunto, forman parte del mecanismo por el cual la adiponectina sensibiliza la acción de la insulina. Esquema tomado de Achari, 2017.

La adiponectina aumenta la expresión y la actividad de los receptores alfa activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR- α) los cuales son factores de transcripción clave en la regulación metabólica, y a su vez favorecen la expresión de la acetil CoA oxidasa (ACO) y las proteínas desacoplantes (UCPs) promoviendo la oxidación de ácidos grasos y el gasto energético (Yamauchi et al., 2003; Minatoya et al., 2013).

La inyección sistémica de adiponectina a ratones lipoatróficos permitió observar elevada oxidación de ácidos grasos (Tishinsky et al., 2012). Debido a que la

acumulación intracelular de ácidos grasos y/o sus metabolitos como la acil coenzima A (acil-CoA), el diacilglicerol (DAG) o las ceramidas desempeñan un papel crítico en la resistencia a la insulina (Lowell y Shulman, 2005), al promover la β -oxidación, la adiponectina genera de forma indirecta una mejora en la señalización muscular de la insulina lo que favorece la captación de glucosa en tejidos periféricos (Tishinsky et al., 2012). En estudios de personas con sobrepeso, obesidad y un alto índice de masa corporal (IMC) se ha mostrado correlación negativa entre los niveles de adiponectina plasmática con el área de grasa visceral (Zoico et al., 2004).

En modelos animales, los ratones KO para adiponectina no presentan diferencias en la tasa de crecimiento e ingesta de alimentos y tienen buena tolerancia a la glucosa e insulina al ser comparados con ratones normales, además de que son animales viables y fértiles normales (Maeda et al., 2002). Cuando éstos ratones son alimentados con dietas altas en calorías, presentan un incremento en los niveles de glucosa e insulina circulantes y al ser tratados con adiponectina se revierten estos valores y se favorece la oxidación muscular de ácidos grasos (Fruebis et al., 2001; Nawrocki et al., 2006).

En ratones KO para los AdipoR's existen alteraciones en la función hepática. Los ratones AdipoR1^{-/-} tienen disminuida la vía de señalización de AMPK, además de que presentan incremento en el tejido adiposo y muestran hiperglicemia e hiperinsulinemia, disminución en la actividad física y en el gasto energético; mientras que, por el contrario, los ratones AdipoR2^{-/-} presentan mitocondrias de mayor tamaño en los adipocitos comparadas con los ratones normales y ratones AdipoR1^{-/-}; y éstos mismos ratones AdipoR2^{-/-} no desarrollan obesidad si son

alimentados con dieta alta en grasas y no presentan estados de hiperglicemia, observándose también que tienen un incremento en la actividad física, mayor gasto de energía y bajos niveles de colesterol (Bjursell et al., 2007).

3.1.3.2 Inflamación

A diferencia de muchas citocinas pro-inflamatorias que son secretadas en el síndrome metabólico, la actividad de la adiponectina es anti-inflamatoria debido a que inhibe la liberación de citocinas pro-inflamatorias tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) de los adipocitos y las células del estroma (Yokota et al., 2000). El tratamiento con adiponectina disminuye la liberación de citocinas pro-inflamatorias inducidas por lipopolisacáridos impidiendo la activación del factor nuclear kappa B (NF κ B) (Ajuwon y Spurlock, 2005). Por otro lado, la adiponectina también promueve la liberación de citocinas anti-inflamatorias, tales como IL-10 (Kumada et al., 2004). La adiponectina reduce la infiltración de macrófagos hacia el tejido adiposo (Kim et al., 2007), inhibe el crecimiento y la diferenciación de los progenitores de linfocitos B de la médula ósea y regula la respuesta inflamatoria en los macrófagos (Yokota et al., 2000).

3.1.3.3 Aterosclerosis

Se ha reportado que la adiponectina tiene efectos anti-ateroscleróticos directos inhibiendo fuertemente la expresión de moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y la E-selectina (Ouchi et al., 1999). Además, en células endoteliales

bloquea la fosforilación del factor NF- κ B evitando los procesos inflamatorios que favorecen la expresión y síntesis de estas moléculas (Golstein y Scalia, 2007).

3.1.3.4 Apoptosis

LA AMPK activada por adiponectina inhibe la apoptosis desencadenada por IKK/NF κ B/PTEN (Achari, 2017)(Figura 3). Estudios recientes muestran que la adiponectina mejora la actividad de las ceramidasa, reduciendo los niveles intracelulares de ceramidas, incrementando la sensibilidad de la insulina de forma independiente a la señalización de AMPK y protegiendo a las células de apoptosis inducida por lípidos (Holland et al., 2011).

3.1.4 La adiponectina en el Sistema Nervioso Central

3.1.4.1 Adiponectina en el cerebro

En la última década se ha obtenido evidencia de que la adiponectina está presente en varias regiones cerebrales y en líquido cefalorraquídeo (LCR) de ratón (Kubota et al., 2007), de rata (Neumeier et al., 2007) y de humano (Neumeier et al., 2007; Une et al., 2009). En el LCR se han detectado únicamente trímeros y hexámeros (Qi et al., 2004; Kos et al., 2007) y no se han visto multímeros de alto peso molecular (Kubota et al., 2007).

Aunque se ha reportado la presencia del mRNA de la adiponectina en la hipófisis de humano y de la rata (Rodríguez-Pacheco et al., 2007) no existe evidencia de su síntesis en tejido cerebral, esto indicaría que la adiponectina que se encuentra en el sistema nervioso central (SNC) se sintetiza en tejidos periféricos (Takeuchi et al., 2013).

Qi y sus colaboradores (2004) observaron un aumento en la cantidad de adiponectina en LCR después de inyectarla de forma intravenosa (IV) en ratones obesos, lo que indica que existe un mecanismo de transporte a través de la barrera hematoencefálica y que es unidireccional.

Se ha documentado la expresión del mRNA del AdipoR1 y AdipoR2 en células del plexo coroideo, una región cerebral relevante para la entrada controlada de moléculas que no permean a través de la barrera hematoencefálica, desde donde la adiponectina podría ser transportada hacia el LCR en un mecanismo de transporte mediado por los AdipoR's; en éstas células también se han identificado receptores funcionales de insulina y leptina (Kos et al., 2007).

3.1.4.2 AdipoR's en el cerebro

Los AdipoR's están presentes en el cerebro de roedores y de humanos, lo que indica que hay actividad de la adiponectina dentro del SNC (Kadowaki y Yamauchi, 2005; Ahima et al., 2005; Thundyil et al., 2012). Estos receptores han sido descritos en hipotálamo (Qi et al., 2004; Kubota et al., 2007; Psilopanagioti et al., 2009), hipófisis (Psilopanagioti et al., 2009), hipocampo (Jeon et al., 2009; Qiu et al., 2011), corteza (Thundyil et al., 2010) y tallo cerebral (Thundyil et al., 2012).

Se ha reportado la presencia de los AdipoR's en células progenitoras neurales (hNSCs) en el hipocampo de la rata (Zhang et al., 2011).

También se ha visto que únicamente el AdipoR1 se expresa en las neuronas sensoriales maduras del epitelio olfatorio de ratones (Hass et al., 2008) y recientemente se ha descrito la presencia de ambos AdipoR's en astrocitos humanos, aunque aún falta conocer sus efectos puntuales sobre las células de la glía (Wan et al., 2014).

3.1.4.3 La adiponectina regula la ingesta de alimento

La adiponectina tiene importante participación en la activación de la AMPK a través del AdipoR1 en el hipotálamo, promoviendo una mayor ingesta de alimentos y la disminución en el gasto energético; por el contrario, ratones deficientes en adiponectina mostraron disminución de la fosforilación de AMPK en el hipotálamo, disminución en la ingesta de alimentos y mayor gasto de energía (Kubota et al., 2007).

Este mecanismo ocurre en los mamíferos después de ingerir alimento, donde disminuyen los niveles de adiponectina, se incrementan los niveles de leptina y

disminuye la actividad de la AMPK hipotalámica (Kola, 2008). De esta forma, se propone que las señales provenientes de adiponectina-leptina pueden representar una vía fisiológica de regulación para la actividad de la AMPK en el hipotálamo, y que funciona como un mecanismo de control para la ingesta de alimentos y de gasto energético (Kubota et al., 2007; Kola, 2008).

También, se ha visto en modelos animales que la adiponectina puede modular la actividad metabólica periférica iniciando cascadas de señalización sobre el hipotálamo; después de la inyección intracerebroventricular (ICV) de adiponectina en ratones se produce una disminución en los niveles de glucosa y lípidos plasmáticos y se estimula la expresión del mRNA de la proteína desacoplante 1 (UCP-1) que participa en la termogénesis y está presente en mitocondrias del tejido adiposo (Qi et al., 2004).

3.1.4.4 Respuesta olfatoria

El descubrimiento de que neuronas del epitelio olfatorio de ratón expresan el AdipoR1, permitió considerar que la adiponectina, puede modular la respuesta del olfato (Hass et al., 2008). Loch y colaboradores (2013) demostraron que las neuronas del epitelio olfatorio son más sensibles a ciertos olores y la actividad eléctrica que generan es más fuerte si han sido tratadas con adiponectina, aunado a esto, se activan un mayor número de células granulosas. Esto podría indicar que la adiponectina favorece que el olfato sea más sensible a los olores, estimulando la conducta para la búsqueda de alimentos después de periodos de ayuno.

3.1.4.5 Proliferación celular

Se demostró que la adiponectina aumenta la proliferación de las hNSCs de rata activando las vías de señalización de AMPK y la proteína cinasa activada por mitógenos p38 (p38MAPK). Los resultados indican que la adiponectina estimula la fosforilación de la glucógeno sintasa cinasa 3 beta (GSK-3 β) con la consecuente acumulación de β -catenina, una proteína que al acumularse interactúa con factores de transcripción que promueven la proliferación celular tanto de neuronas como de astrocitos (Zhang et al., 2011).

3.1.4.6 Neuroprotección

Se ha probado la actividad neuroprotectora de la adiponectina en modelos celulares de toxicidad inducidos por ácido kaínico (KA). En cultivos celulares tratados con adiponectina, se ven reducidos los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno, menor activación de la caspasa-3 y de apoptosis. El mecanismo de neuroprotección de la adiponectina implica la activación de la señalización de la AMPK (Qiu et al. 2011).

Jeon y colaboradores (2009) con ratones que recibieron un pretratamiento de adiponectina demostraron menor muerte celular en el hipocampo después de la administración de KA, aunado a que se encontró reducción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y el factor de transcripción NF- κ B. Estos datos indican que la adiponectina evita la angiogénesis, disminuye la infiltración en la barrera hematoencefálica e inhibe actividad proinflamatoria después del tratamiento con KA, favoreciendo a la supervivencia neuronal.

En un modelo de isquemia-reperfusión en rata, la adiponectina disminuye el contenido de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-8 y TNF- α , el factor NF- κ B, así como la metaloproteasa 9 (MMP9), la mieloperoxidasa (MPO) y la inmunoglobulina G (IgG) que son marcadores de infiltración de la barrera hematoencefálica (Chen et al., 2009), mostrando la capacidad de la adiponectina para mantener la integridad de los endotelios cerebrales.

En otro estudio, se descubrió que ratones KO para adiponectina sufrían crisis convulsivas de mayor severidad y duración, ocasionadas por tratamiento con KA, en comparación con ratones *wild type* (Lee et al., 2011). Aunque este efecto parece ser el resultado de los cambios metabólicos que acompañan a la ausencia de adiponectina, los datos obtenidos proporcionan una referencia de la relación entre la hipoadiponectinemia y las convulsiones.

3.1.4.7 Enfermedad Tipo Alzheimer

Se ha reportado que la cantidad de adiponectina en LCR en adultos mayores con deterioro cognitivo es elevada, comparada con individuos sanos y de la misma edad. En estudios con pacientes, se pudo corroborar que hay una correlación positiva entre la cantidad de adiponectina en LCR y deterioro cognitivo leve. Aunque esto no es indicativo de deterioro neuronal, podría estar relacionado con manifestaciones clínicas, como pérdida de peso, disminución de grasa corporal y del apetito que están presentes en pacientes que cursan estadios tempranos de la enfermedad tipo Alzheimer (EA) (Une et al., 2009).

En un modelo de células de neuroblastoma humano transfectadas con la *Swedish APP mutation* (Sw-APP), responsable de la mayoría de los casos de la EA familiar,

al sobreexpresar el péptido beta amiloide (β A), característico de la EA, aumentó la producción celular de especies reactivas de oxígeno. Para probar la capacidad protectora de la adiponectina se pretrataron algunos cultivos, y observaron que se protege a las células que sobreexpresan la Sw-APP del estrés oxidativo inducido por H_2O_2 y este efecto protector depende de la activación de la AMPK mediada por la proteína adaptadora APPL1 (Chan et al., 2012).

El estrés oxidativo, en estadíos tempranos de la EA, causa alteraciones en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, así como activación de genes de moléculas proinflamatorias como IL-6 e interferón gamma (IFN- γ) (Jones et al., 2009), provocando disfunción celular, degeneración neuronal y muerte (Moreira et al., 2009).

3.1.4.8 Apoptosis

Jung y colaboradores (2006) observaron que la adiponectina favorece la supervivencia celular en un modelo de neuroblastoma, usando la línea SH-SY5Y y tratamiento con 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+), inhibidor del complejo mitocondrial 1. El tratamiento con adiponectina provoca un aumento del mRNA de la proteína antiapoptótica Bcl-2, una baja en la expresión de las proteínas proapoptóticas Bax y caspasa-3, así como una menor liberación de citocromo C.

Analizando muestras de pacientes con glioblastoma, se describió por primera vez, la presencia de los AdipoR's en astrocitos humanos (Porcile et al., 2014). En el mismo estudio, en las cepas U251 y la U87-MG de glioblastoma humano, después de tratamientos con adiponectina mostraron *in vitro* la disminución de la proliferación celular, que correlaciona con una menor replicación de DNA y una

activación moderada de las vías proliferativas de las cinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2) y de la proteína cinasa b (Akt). En conjunto, estos datos sugieren que la adiponectina inhibe el crecimiento y proliferación en cultivos celulares de glioblastoma (Porcile et al., 2014).

3.1.4.9 Actividad proinflamatoria y proapoptótica de la adiponectina en SNC

En sentido contrario a la actividad protectora que ofrece la adiponectina al tejido cerebral, Thundyil y colaboradores (2010) encontraron un incremento de muerte celular en un modelo de cultivos corticales primarios de ratón, los cuales tuvieron condiciones isquémicas; en este estudio, las neuronas incrementan la expresión y síntesis del AdipoR1 y un aumento en la activación de la caspasa-3, este efecto es aún mayor si los cultivos son tratados con adiponectina. Este estudio revela que la adiponectina exacerba actividad apoptótica en células con un daño tipo isquémico, y esta respuesta no había sido descrita en tejidos periféricos ni en SNC.

Wan y colaboradores (2014) demostraron que cultivos de glioblastoma humano de la línea celular U373 tratados con trímeros de adiponectina globular generan una respuesta proinflamatoria; obtuvieron un aumento en la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y en IL-6, IL-1 β e IL-8. Estos datos proporcionan evidencia de que los trímeros globulares de adiponectina pueden inducir actividad proinflamatoria en los astrocitos humanos, aunque no está clara su participación en el desarrollo de enfermedades dentro del SNC.

3.2 Insulina

3.2.1 Generalidades de la insulina

La insulina es una hormona peptídica que tradicionalmente se ha asociado al control y metabolismo de glucosa. Actualmente se sabe que genera múltiples respuestas que son órgano-específicas. Tiene acción a diferentes niveles, tanto en órganos y sistemas periféricos como en SNC.

La insulina está formada por dos cadenas peptídicas unidas por puentes disulfuro. La síntesis y secreción de la insulina en el páncreas es mayormente regulada por la glucosa, la cual actúa como una señal del estado de energía que guarda el organismo (Wang et al., 1997). La glucosa tiene acción a diferentes niveles para aumentar la síntesis de la insulina, alargar la estabilidad del mRNA disminuyendo su degradación y acrecentar la traducción y el procesamiento de proinsulina a insulina (Oliart et al., 1998). Aunque la glucosa es el mayor estímulo para la liberación de insulina, también se ha demostrado que otros estímulos como las sulfonilureas favorecen esta secreción (Ghasemi et al., 2012).

3.2.2 El receptor de insulina

El receptor de insulina (InsR) se sintetiza como un pre-proreceptor, del cual se escinde un péptido señal de 30 aminoácidos. Este pro-receptor es sometido a glicosilación, plegamiento y dimerización. En el aparato de Golgi, las cadenas dimerizadas son proteolizadas para formar las subunidades alfa y beta. Estos péptidos son unidos a través de enlaces disulfuro para formar un heteroreceptor tetramérico (Youngren, 2007). Las subunidades alfa son extracelulares y se acomodan para formar el centro de unión para una única molécula de insulina. Las

subunidades beta tienen diferentes regiones: extracelular, transmembranal, yuxtamembranal, y dominio de tirosina cinasa, que tienen la particularidad de transfosforilarse (Stryer, 2007).

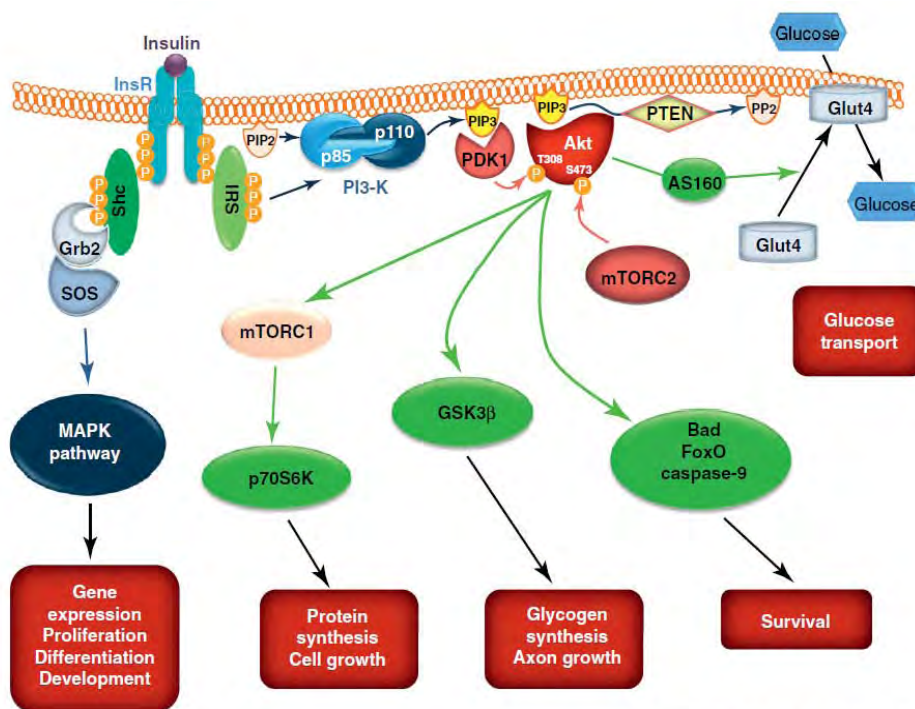
La unión de insulina a las subunidades alfa resulta en un cambio conformacional que induce la transfosforilación de distintos residuos de tirosina en las subunidades beta. Después de la fosforilación, ocurre un cambio conformacional que activa la actividad de tirosina cinasa (Voet, 2006). A pesar de que la transfosforilación y la actividad de tirosina cinasa están vinculadas, son aspectos separados de la función del receptor de insulina que pueden ser desacoplados y están sujetos a diferentes mecanismos de regulación (Youngren, 2007).

3.2.3 Señalización de la insulina

En la señalización de la insulina, existen dos mecanismos principales para la transducción de señales, uno de ellos a través de la Shc-2 (Sarcome Homology 2-containing domain) la cual es una proteína adaptadora que inicia la vía de señalización hacia las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK's) (White, 1998) que median una amplia variedad de actividades celulares como la expresión génica, la maquinaria del ciclo celular, metabolismo celular, motilidad, supervivencia, apoptosis, y diferenciación (Krishna y Narang 2008).

Por otro lado, la vía de señalización de los sustratos del receptor de insulina (IRS's), que son proteínas de andamiaje específicas del receptor de insulina y del receptor del factor de crecimiento tipo insulínico tipo 1 (IGF-1R) (Siddle, 2011), lleva a la activación de la cinasa de fosfatidilinositol-3 (PI3K). PI3K activada, puede mediar funciones celulares a través de las vías de señalización específicas, como

la proteína cinasa Akt. Proteínas intracelulares que son objetivos de Akt incluyen la GSK3, miembros de la familia de factores de transcripción Forkhead box O (FoxO), y el objetivo de la rapamicina en mamíferos (mTOR). Estas enzimas y factores de transcripción intracelulares regulan funciones metabólicas tales como el metabolismo de glúcidos, síntesis de proteínas y sobrevivencia celular (Acosta-Martínez, 2011) (Figura 5).



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Figura 5. La unión de la insulina a su receptor estimula la autofosforilación de éste, permitiendo el reclutamiento de diferentes proteínas que sirven de andamiaje para el inicio de cascadas de señalización. Los sustratos activados median en tejidos periféricos diversas respuestas como metabolismo de glúcidos, lípidos, síntesis de proteínas y proliferación celular (Kim, 2012)

3.2.4 Actividad de la insulina en tejidos periféricos

Debido a que la insulina es una hormona pleiotrópica, las respuestas celulares en las que participa dependen del tejido en el cual se une a su receptor (Mournier y Posner, 2006); a través de éste, tiene diferentes efectos: es esencial en el mantenimiento del nivel de glucosa en sangre por que favorece la absorción de

glucosa de la circulación al inducir la translocación de transportadores de glucosa del citoplasma hacia la membrana plasmática en músculo esquelético (Voet, 2006); aumenta la velocidad de la glucólisis por la estimulación de la actividad de la hexocinasa y de la 6-fosfofructocinasa promueve la síntesis de glucógeno tanto en hígado como en músculo (Dimitriadis et al., 2011).

También, estimula la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, y disminuye la velocidad de la lipólisis en el tejido adiposo. Aumenta la velocidad de formación de lipoproteínas de baja densidad en el hígado, así como la absorción de los triglicéridos de la sangre hacia tejido adiposo y músculo. Reduce la tasa de oxidación de los ácidos grasos en el músculo e hígado, así como, aumenta la velocidad de síntesis de colesterol. Tiene participación en el metabolismo de proteínas al aumentar la velocidad de transporte de algunos aminoácidos hacia los tejidos. Favorece la velocidad de síntesis de proteínas en músculo, tejido adiposo e hígado. Disminuye la tasa de degradación de proteínas en el músculo y otros tejidos. Por éstas respuestas, la insulina se considera una hormona anabólica al estimular la síntesis de carbohidratos, lípidos y proteínas a nivel periférico (Dimitriadis et al., 2011).

Además de su participación en vías de señalización celular de procesos metabólicos, la insulina puede modular la transcripción de genes. Se han identificado, en hígado, algunos elementos de respuesta a insulina (IREs), tal es el caso de los Elementos de Respuesta a Esteroles (SRE) que se unen a factores de transcripción de la familia de proteínas de unión a los SRE (SREBP), algunos de los cuales están asociados al metabolismo de lípidos (Mournier y Posner, 2006).

También, las proteínas FoxO tienen un papel importante como factores de

transcripción en la mediación de los efectos de la insulina sobre diversas funciones fisiológicas, incluyendo proliferación celular, apoptosis y metabolismo (Barthel et al., 2005). Se ha descrito que estos efectos pueden ser directos sobre secuencias de respuesta a insulina, reclutando otros factores de transcripción hacia sus sitios de unión y en el sentido contrario, “secuestrando” factores de transcripción o coactivadores impidiendo que se unan a sus sitios de acción, regulando a la baja procesos de expresión génica (Barthel et al., 2005).

El síndrome metabólico (SM) es un grupo de desórdenes metabólicos como la obesidad abdominal, dislipidemia aterogénica, hipertensión arterial, resistencia a la insulina (RI) con o sin estados de hiperglicemia, estado proinflamatorio y protrombótico, los cuales se encuentran relacionados con el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y como un factor muy importante para desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Kim, 2012). La RI se define como un estado de sensibilidad reducida de los tejidos, con un incremento en los niveles normales de insulina circulante. (Kim, 2012).

La DM2 es una enfermedad caracterizada por un estado de hiperglicemia crónico, alteraciones metabólicas en diversos órganos y deterioro en la síntesis, liberación o actividad de la insulina (Han y Li 2010).

3.2.5 Actividad de la insulina en Sistema Nervioso Central

3.2.5.1 Control de homeostasis de energía

Una respuesta ampliamente estudiada por el estímulo de insulina es la captación de glucosa, la cual ocurre a través de la translocación hacia la membrana de los transportadores de glucosa (GLUT's). Anteriormente, se consideraba al cerebro como un órgano donde la insulina no participaba en la captación de glucosa. Hasta la fecha, 14 GLUT's han sido identificados, de los cuales 7 se expresan en el cerebro. De estos 7 transportadores GLUT1 y GLUT3 son los principales responsables de la absorción de glucosa en neuronas y células gliales. GLUT1 se encuentra en células del endotelio cerebral y facilita el transporte de glucosa desde la sangre a través de la barrera hematoencefálica; también se expresa en astrocitos. Por el contrario, GLUT3 se expresa mayormente en las neuronas y es responsable de la entrada de glucosa a las neuronas (Koekkoek, 2017).

El hipotálamo es la región cerebral fundamental para la integración de señales relacionadas con el hambre y la saciedad procedentes de la periferia. El hipotálamo contiene muchos receptores de insulina. La función de la insulina en hipotálamo es aumentar la actividad de las células que liberan hormonas anorexigénicas, como la hormona estimulante de los melanocitos (MSH), la procedente de la pro-opiomelanocortina (POMC) y el transcrito relacionado con cocaína y anfetamina (CART); además de inhibir la actividad de las neuronas que producen hormonas orexigénicas como el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con Agouti (AgRP)(Mendieta-Zerón et., 2007). A la vez, la regulación neuronal está relacionada con mecanismos de control periféricos, donde, al existir estímulo de insulina sobre el hipotálamo, se produce respuesta hepática,

reduciendo la producción de glucosa a partir de glucógeno (Girard, 2006). La insulina se comporta como una hormona con una fuerte actividad anabólica en tejidos periféricos, mientras que su acción dentro del hipotálamo es de un factor catabólico (Escrivá, 2010).

3.2.5.2 Aprendizaje y memoria

El hipocampo, es una de las áreas más estudiadas del SNC en mamíferos. Gran parte de lo que se sabe acerca de la plasticidad y transmisión sináptica proviene del trabajo con esta estructura. El hipocampo está implicado en mecanismos de aprendizaje y procesos de memoria (Witter, 2001).

En estudios de comportamiento Zhao y colaboradores en 1999, demostraron que los niveles del mRNA del InsR en las regiones CA1 y giro dentado del hipocampo aumentan en ratas que han sido entrenadas en pruebas de laberinto de agua. De manera interesante, Dou y colaboradores (2005) mostraron que los niveles de expresión del receptor de insulina cambian de forma región específica después de entrenamiento en el laberinto de agua; el mRNA del InsR aumentó en CA1 mientras que en CA3 disminuyó. Se ha sugerido de forma importante que la vía señalización de la insulina tiene un papel modulador en los procesos de aprendizaje y memoria (Banks et al., 2012), aunque es posible que ante el deterioro en la señalización de la insulina, existan otros mecanismos celulares que traten de compensar esta función (Dou et al., 2005).

La presencia de los InsR en las espinas dendríticas sugiere que la insulina está relacionada con procesos sinápticos (Banks et al., 2012). Se relaciona a estas respuestas neuronales con la actividad de cinasa del InsR (Park, 2001). La

insulina puede aumentar la fosforilación de las subunidades NR2A and NR2B de los receptores NMDA (Christie et al., 1999). Otros trabajos incluyen que la modulación de canales de K^+ , la activación de receptores de GABA así como la regulación del flujo de Na^+ y Ca^{2+} mediado por glutamato, son modulados por la insulina. Estos resultados soportan el papel de la insulina en el reclutamiento de la maquinaria necesaria para la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria (Park et al., 2000; Banks et al., 2012) (Figura 6).

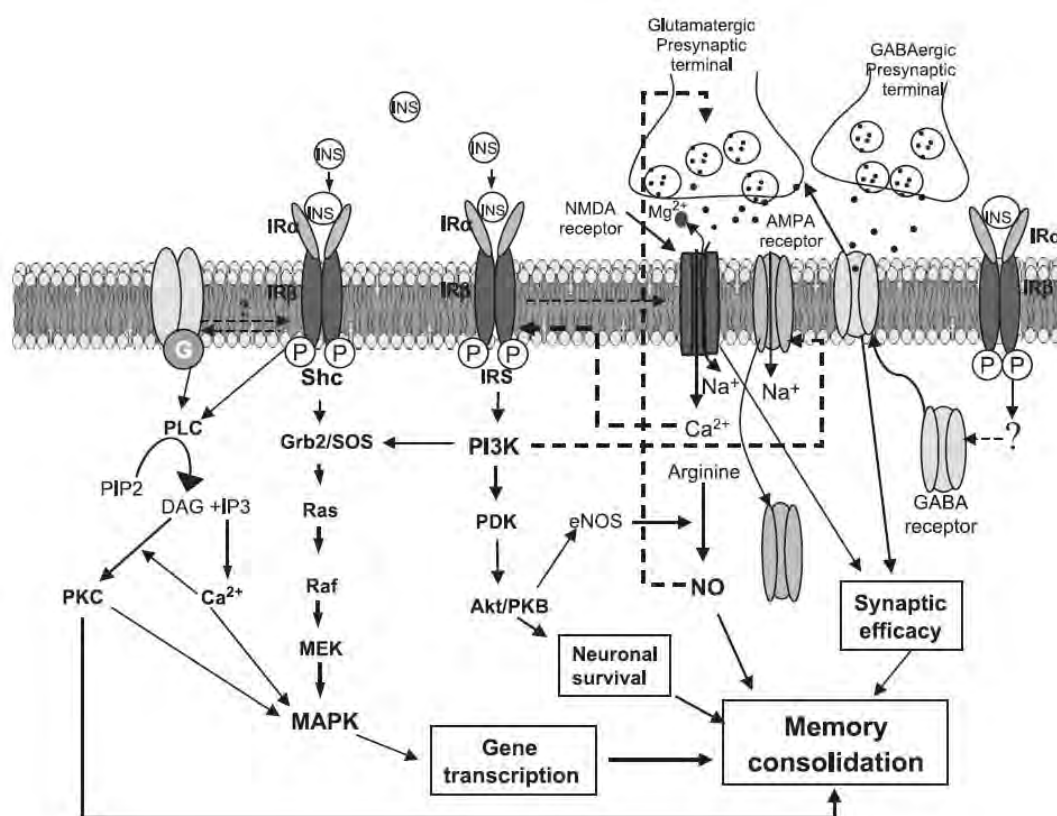


Figura 6. La insulina modula la transmisión sináptica a través de interacción con los receptores AMPA y NMDA de glutamato en procesos excitatorios; también en procesos inhibitorios promoviendo la exposición membranal de los receptores de GABA. A través de las MAPK's y de la fosfolipasa C, involucra genes que favorecen la consolidación de la memoria (Zhao, et al 2004).

Los mecanismos antes descritos, son procesos en los cuales se justifica la memoria: potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD). La LTP se produce cuando una neurona presináptica excita a la postsináptica de

manera prolongada y repetida, y el estado de despolarización queda reforzado. Esto implica una entrada de Ca^{2+} de modo tal, que las vías de señalización dependientes de éste se prolongan. Dentro de la LTP también existe una remodelación del citoesqueleto, incluyendo a las espinas dendríticas, para facilitar las conexiones. La LTD es un mecanismo compensatorio, donde la neurona que fue sometida a la LTP, tiene una disminución en la transmisión sináptica y de este modo queda preparada para almacenar nueva información (Escrivá, 2010).

Experimentos con ratas que recibieron entrenamiento e inyecciones de insulina directamente en el cerebro mostraron mayor rendimiento en tareas de memoria en comparación con animales que tuvieron adiestramiento previo y no recibieron insulina (Park et al., 2000). Zhao y colaboradores (2004), postularon que la actividad neuromoduladora de la insulina proviene de la expresión de genes y síntesis de proteínas que influyen en la actividad sináptica y respuestas postsinápticas y no a través del metabolismo de glucosa.

3.2.5.3 Sobrevivencia neuronal

La evidencia de que la señalización de la insulina participa en sobrevivencia neuronal se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante el uso de ratones knockout del InsR neuronal (NIRKO). Cultivos neuronales de ratones NIRKO muestran una baja fosforilación de PI3K y Akt en respuesta a insulina y también exhiben una protección disminuida contra un estímulo de KCl, cuando esta vía de señalización está regulada a la baja, se abate la capacidad antiapoptótica de la insulina. En contraparte, la inhibición de la vía de señalización de las MAPK's no produce este efecto; esto sugiere que la vía de acción de la insulina para la

sobrevivencia neuronal es a través de PI3K (Schubert et al., 2004).

Akt protege a las células frente a estímulos apoptóticos mediante la inactivación de proteínas proapoptóticas, tales como los miembros la familia Bad y Bax, la caspasa 9, y factores de transcripción, incluyendo los FoxO, CREB, e I κ B cinasa (IKK), un regulador de NF- κ B (Rodgers y Theibert 2002).

De manera contraria a lo que ocurre en los cultivos neuronales de ratones NIRKO, los cerebros de estos animales no manifiestan alteraciones morfológicas ni hay evidencia de un incremento en la apoptosis. Esto lleva a pensar que en ausencia de InsR en las neuronas, otros factores neurotróficos pueden compensar el desarrollo de los ratones NIRKO (Van der Heide et al., 2006).

3.2.5.4 Relación entre la insulina, su receptor y las enfermedades neurodegenerativas: enfermedad Tipo Alzheimer

El cerebro de los mamíferos requiere un suministro constante de energía, la cual se obtiene de la glucosa, y en consecuencia, existe una alta tasa de oxidación. A diferencia de lo que ocurre en tejidos periféricos, en el cerebro, la insulina no es el principal regulador en la captación de glucosa (Vannucci et. Al., 1998).

Hay evidencia que sustenta una asociación entre alteraciones metabólicas y enfermedades neurodegenerativas. Se han reportado casos de hiperinsulinemia sin niveles elevados de glucosa, como un factor de riesgo para una disminución cognitiva (Luchsinger et al., 2004). También, las elevaciones en niveles de glucosa circulante, al igual que en tejidos periféricos, pueden afectar a las células del SNC; un estado crónico de hiperglicemia genera daño celular por glucotoxicidad (Tomlinson y Gardiner 2008).

En sentido contrario a lo que ocurre con infusiones agudas de insulina, donde se ha visto que mejora la memoria en pacientes diagnosticados con EA (Craft et al., 1999), un estado de hiperinsulinemia crónica afecta la función y sobrevivencia de las neuronas (Schäfer y Erdö 1991).

La asociación entre la DM2 y las enfermedades neurodegenerativas está en la disminución del contenido del InsR neuronal, como es el caso de la EA y la de Parkinson (Plum et al., 2005). Aunque las causas que desencadenan estos padecimientos neuronales no están totalmente claras, la evidencia experimental muestra, además de RI, la disminución en el metabolismo de glucosa, así como la disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y niveles elevados de citocinas asociados a procesos inflamatorios (Kaidanovich-Beilin et al., 2012).

La EA es un padecimiento neurodegenerativo, lento, progresivo y que es asintomático durante varios años. Hasta hoy, las causas de la EA y un diagnóstico temprano son difíciles de establecer. Las características neuropatológicas de la EA incluyen a depósitos extracelulares del β A así como de marañas neurofibrilares (NFT) compuestas por la proteína Tau hiperfosforilada, lo que conlleva a la muerte neuronal (Candeias et al., 2012).

Se ha demostrado la existencia de anormalidades en la señalización de la insulina en cerebros de pacientes con EA. Estas anomalías fueron asociadas con niveles reducidos del mRNA del IRS1 y la disminución de la actividad del complejo PI3K-Akt, generando un trastorno de señalización neuronal que se asemeja a la DM2. Además, el complejo PI3K-Akt-GSK3 β es responsable de fosforilar a la proteína Tau, la cual tiene la función de estabilizar los microtúbulos axonales a través de la interacción con la tubulina (Moreira et al., 2007).

Las vías de señalización de la insulina en las neuronas pueden promover la generación del péptido β A, mediante la modulación de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP), la cual genera péptidos de 40 o 42 aminoácidos (β A40 y β A42) que forman los depósitos extracelulares (Neumann et al., 2008).

Se ha visto que la enzima degradadora de insulina (IDE) también es capaz de proteolizar fragmentos de β A, pero no de remover agregados. La formación de depósitos amiloidogénicos puede estar aumentada por la competencia de la insulina por su enzima de degradación (Qiu et al., 1998).

El cerebro utiliza la glucosa como fuente primaria de energía. La síntesis del neurotransmisor acetilcolina, es dependiente de la acetil coenzima A (A-CoA). Alteraciones en la captación o metabolismo de la glucosa afectan la síntesis de acetil-CoA (Bigl et al., 1987). La acumulación del péptido β A alrededor de las neuronas, también participa en la disminución de la captación de glucosa. La deficiencia en la actividad del sistema colinérgico es una característica más de la EA (Zhu et al., 2005).

3.3 Bulbos olfatorios

Los bulbos olfatorios son estructuras pareadas que se encuentran en la base del cerebro directamente sobre la lámina cribosa (Figura 7).

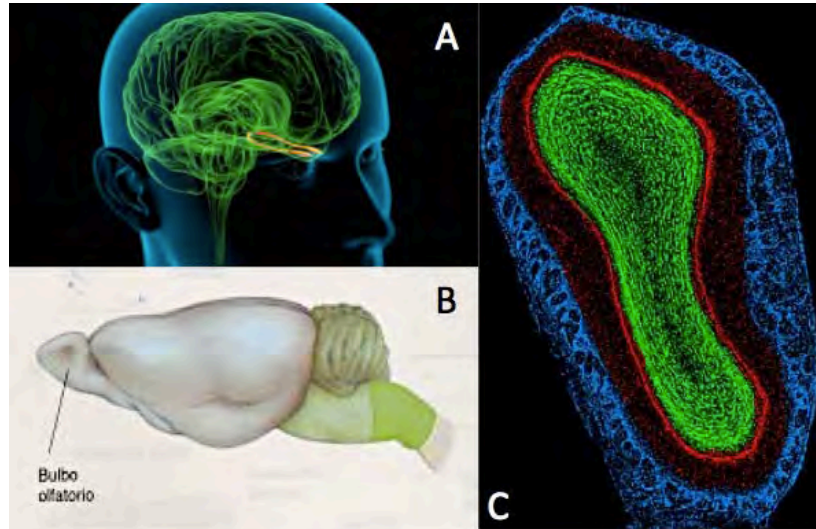


Figura 7. Esquemas que muestran la ubicación de los bulbos olfatorios en el cerebro del humano (A) y de la rata (B). Microfotografía donde se observan las capas de células periglomerulares (azul), mitrales (rojo) y granulosas (verde) en un corte coronal de bulbo olfatorio de rata (C). Imágenes tomadas de prairiemaary.blogspot (A) Bear, 2008 (B), wikipedia (C).

En los bulbos se establecen redes neuronales complejas y realiza procesamientos de información antes que ésta sea enviada a la corteza cerebral (Kay y Sherman, 2007). Actualmente se propone que en los bulbos olfatorios puedan ser detectados padecimientos neurodegenerativos en etapas tempranas (Cleland y Linstner, 2005).

La ingesta de alimentos se basa en la interacción entre la percepción de olores y la regulación energética. Al ser el olfato una de las principales vías de percepción sensorial, contribuye a la evaluación de olores de los alimentos para su posible elección y consumo (Palouzier-Paulignan et al., 2012).

El ayuno o la saciedad influyen en la detección de olores por los individuos. En ayunas hay mayor capacidad para detectar olores, mientras que la saciedad reduce la capacidad de detectarlos, especialmente los que están asociados con los alimentos (O'Doherty et al., 2000; Mulligan et al., 2002).

Los estímulos aromáticos son captados por el epitelio olfatorio y transducen las señales a través de los nervios olfatorios que ingresan selectivamente y se ramifican en la capa de células periglomerulares, que es la capa celular más externa del bulbo olfatorio, donde cada glomérulo es una unidad funcional (Mombaerts et al., 1996).

Las dendritas de las principales neuronas del bulbo, las células mitrales, hacen sinapsis con las dendritas de los nervios olfatorios dentro de los glomérulos. Cada célula mitral extiende dendritas secundarias para hacer sinapsis con las interneuronas locales y las células granulosas. Las células granulosas son las más numerosas en el bulbo olfatorio, y dan lugar a la capa más profunda del bulbo olfatorio, la capa de células granulosas. El 80% de los contactos sinápticos con células granulares son recíprocos. La conexión mitral-granulosa es excitatoria y la granulosa-mitral inhibitoria. (Shepherd et al., 2004).

Dentro del bulbo olfatorio actúan hormonas metabólicas que regulan procesos celulares del hambre y la saciedad; son clasificados como factores orexigénicos o anorexígenos, dependiendo de su papel estimulador o inhibitor en la ingesta de alimentos, respectivamente. Desde hace años se han estudiado los receptores para las hormonas metabólicas y se sabe que se expresan en áreas cerebrales relacionadas con el olfato, siendo el epitelio y el bulbo olfatorio muy importantes para esta actividad (Tabla 1) (Palouzier-Paulignan et al., 2011).

Tabla 1. Comparativo de señales orexigénicas, anorexigénicas y sus receptores en estructuras olfatorias y el hipotálamo

+ = presente; - = ausente; nd = no determinado

Modificado de Palouzier-Paulignan (2011).

Señales orexigénicas				
		Mucosa olfatoria	Bulbo olfatorio	Hipotálamo
Grelina	Molécula (Péptido)	nd	+	+
	Molécula (mRNA)	nd	-	+
	Receptor (Péptido)	nd	+	+
	Receptor (mRNA)	nd	+	+
NPY	Molécula (Péptido)	+	+	+
	Molécula (mRNA)	+	+	+
	Receptor (Péptido)	+	+	+
	Receptor (mRNA)	+	+	+
Orexinas	Molécula (Péptido)	+	+	+
	Molécula (mRNA)	+	+	+
	Receptor (Péptido)	+	+	+
	Receptor (mRNA)	+	+	+
MCH	Molécula (Péptido)	nd	nd	+
	Molécula (mRNA)	nd	nd	+
	Receptor (Péptido)	nd	+	+
	Receptor (mRNA)	nd	+	+
Endocannabinoides	Molécula (Péptido)	+	nd	+
	Molécula (mRNA)	+	nd	+
	Receptor (Péptido)	+	+	+
	Receptor (mRNA)	nd	+	+
Opiodes	Molécula (Péptido)	nd	+	+
	Molécula (mRNA)	nd	nd	+
	Receptor (Péptido)	+	+	+
	Receptor (mRNA)	+	+	+
Adiponectina	Molécula (Péptido)	nd	+	+
	Molécula (mRNA)	nd	nd	+
	Receptor 1 (Péptido)	+	nd	+
	Receptor 1 (mRNA)	+	nd	+
	Receptor 2 (Péptido)	nd	nd	+
	Receptor 2 (mRNA)	nd	nd	+

Señales anorexigénicas				
		Mucosa olfatoria	Bulbo olfatorio	Hipotálamo
Insulina	Molécula (Péptido)	+	+	+
	Molécula (mRNA)	+	+	+
	Receptor (Péptido)	+	+	+
	Receptor (mRNA)	+	+	+
Leptina	Molécula (Péptido)	+	+	+
	Molécula (mRNA)	+	+	+
	Receptor (Péptido)	+	+	+
	Receptor (mRNA)	+	+	+
CCK	Molécula (Péptido)	+	+	+
	Molécula (mRNA)	+	-	-
	Receptor (Péptido)	+	+	+
	Receptor (mRNA)	+	+	+
Bombesinas	Molécula (Péptido)	nd	+	+
	Molécula (mRNA)	nd	+	+
	Receptor (Péptido)	nd	-	+
	Receptor (mRNA)	nd	-	+
CRF	Molécula (Péptido)	+	+	+
	Molécula (mRNA)	+	+	+
	Receptor (Péptido)	+	+	+
	Receptor (mRNA)	+	+	+
Glucosa	Molécula	+	+	+
	Transportador (Péptido)	+	+	+
	Transportador (mRNA)	+	+	+
Amino ácidos	Amino ácidos	nd	nd	+
	Sensor	nd	nd	+

NPY = Neuropeptido Y; MCH = hormona concentradora de melanina; CCK = colecistocina; CRF= factor liberador de corticotropinas

3.4 Hipocampo

En el cerebro de los mamíferos, la formación hipocampal es una región importante del sistema límbico y se conforma propiamente por el hipocampo, el giro dentado, el complejo subicular y la corteza entorrinal (Schultz y Engelhardt, 2014), aunque de forma convencional, el término hipocampo se utiliza para designar a la formación hipocampal (Figura 8).

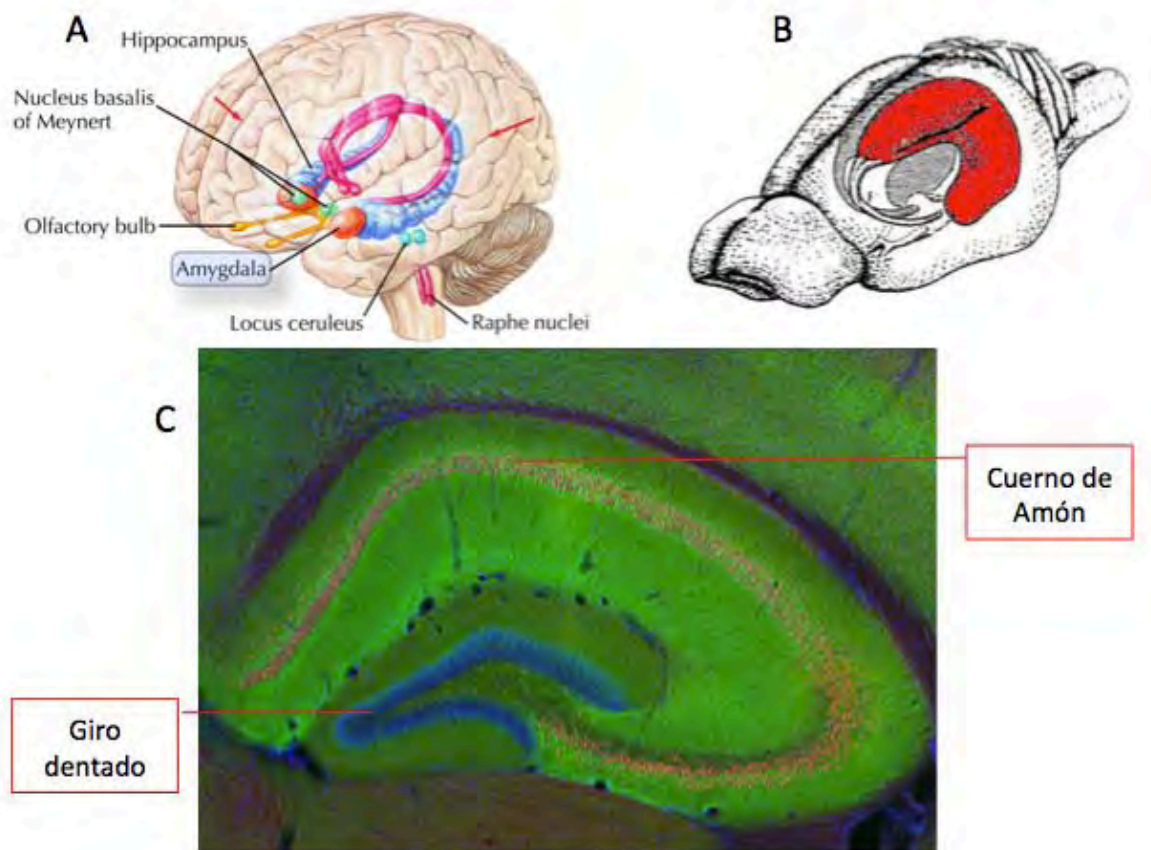


Figura 8. Esquemas que muestran la ubicación del hipocampo en el cerebro del humano (A) y de la rata (B). Microfotografía donde se observan las regiones del Cuerno de Amón y Giro dentado en un corte coronal de hipocampo de rata. Imágenes tomadas de (A) sciencedaily.com (B) disqus.com (C) sysy.com.

El interés para el estudio del hipocampo se debe a que funcionalmente es la región en donde se lleva a cabo el mecanismo neuronal del aprendizaje y la memoria, así como a su organización estructural, a la gran cantidad de conexiones

sinápticas (Reznikov, 1991) y a los procesos de proliferación en estadios embrionarios y de neurogénesis en adultos (Urbán y Guillemot, 2014). Esto hace del hipocampo el modelo experimental más empleado para el estudio de circuitos neuronales y la plasticidad neuronal del SNC.

El hipocampo está delimitado en tres regiones bien definidas denominadas *cornu Ammonis* (CA): CA1, CA2 y CA3. En esta región las células piramidales son las más numerosas. En el giro dentado, las células granulares son el principal grupo celular. En ambos grupos, el flujo de la información sigue una vía excitatoria unidireccional. Alrededor de estas células se han descrito diferentes grupos de células inhibitorias, clasificadas por su localización, forma y distribución axonal, entre las que se encuentran las células de canasta y las células musgosas, entre otras (Traub y Miles, 1991).

Algunas de las vías de neurotransmisión dentro del hipocampo son: la vía perforante, que se origina en la corteza entorrinal; las fibras musgosas, que conectan células granulares del giro dentado con células piramidales de CA3; las conexiones colaterales de Schaffer donde hacen sinapsis células de CA3 con células de CA1; las conexiones comisurales; las conexiones excitatorias recurrentes entre las células piramidales de CA3 y entre células de CA1; el circuito inhibitorio, donde las células inhibitorias son excitadas por células piramidales locales, por células aferentes o por ambas (Traub y Miles, 1991).

En el hipocampo se encuentran expresados receptores de diferentes moléculas relacionadas con el metabolismo energético como grelina (Diano et al., 2006), neuropéptido Y (Ledri et al., 2015), orexinas (Trivedi et al., 1998), hormona concentradora de melanina (Varas et al., 2002), insulina (Zhao et al., 1999), leptina

(Harvey y Ashford, 2003), colecistocinina (Beinfeld et al., 1981) y los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3 (Vanucci et al., 1994).

Péptido	Ingesta de alimentos	Neurogénesis	LTP	Reconocimiento de objetos nuevos	Laberinto de agua de Morris
Grelina	+	+	+	+	+
Neuropéptido Y	+	+	-	nd	+ / -
Galanina	+	+	-	nd	-
BDNF	-	+	+	+	+
Obestatina	0	nd	nd	+	nd
Neuropéptido S	-	nd	nd	+	+
Nociceptina	-	+	-	-	-
CART	-	+	nd	nd	+
Orexina	+	+	+ / -	nd	-
Adiponectina	nd	nd	nd	nd	nd

LTP = Potenciación a largo plazo. BDNF = factor neurotrófico derivado de cerebro. CART = transcrito relacionado con cocaína y amfetamina. nd = no definido. 0 = sin efecto.

Tabla 2. Efecto sobre la conducta alimentaria, neurogénesis y funciones cognitivas de algunos péptidos que actúan en el hipocampo. (Beck y Pourié, 2013)

Hay un número amplio de péptidos vinculados a la memoria dentro del hipocampo, esto ilustra la complejidad de los mecanismos que conducen a la creación de las funciones cognitivas; aunque es notorio que el aprendizaje y la memoria cursan a través de las vías celulares comunes (ERK 1/2, PI3K, CREB), siempre con efectos muy particulares (Tabla 2) (Beck y Pourié, 2013). Esta complejidad es aún mayor debido a la distribución y la localización de los receptores en las diferentes regiones del hipocampo. Cada zona y grupo celular puede ser un sitio de regulación precisa (Aradillas et al., 2011).

Hay que enfatizar que la memoria no está directamente vinculada a las acciones de diversos péptidos sobre la neurogénesis. Con el aprendizaje aumenta la

supervivencia celular y hay mayor integración en las redes neuronales del hipocampo. Sin embargo, la neurogénesis y la memoria no siempre están relacionados (Leuner et al., 2006).

Los efectos estimulantes o inhibitorios de diversos péptidos sobre la conducta alimentaria generalmente no están asociados a la formación de la memoria, debido principalmente a que son diferentes los sitios de acción en el cerebro. Sin embargo, las acciones de los péptidos no son completamente independientes, debido a que el hipotálamo y el hipocampo están interconectados (Risold y Swanson, 1996).

4. Planteamiento del problema

La adiponectina tiene un papel crucial en la señalización de la insulina en tejidos periféricos. A pesar de los efectos benéficos que genera la adiponectina en tejidos periféricos, es poco lo que se sabe acerca de los procesos que regula en el SNC así como las interacciones neuroendócrinas con otras moléculas, y de forma específica, con la insulina.

El deterioro de la señalización de la insulina en el cerebro está descrito como una importante causa para el déficit de cognición y memoria. Por ello, es importante el estudio de factores que favorezcan la actividad de la insulina en SNC; la adiponectina, con su probada actividad periférica, podría generar este efecto en el cerebro.

Para lograr este objetivo, se utilizó un modelo animal donde se administró adiponectina exógena a diferentes regiones del SNC con la consecuente evaluación del contenido del InsR. Este trabajo permitió comprender mecanismos celulares de la interacción entre adiponectina e insulina en SNC.

Medir el contenido plasmático de adiponectina empieza a ser considerado un marcador para evaluar disfunciones metabólicas. Es posible que los niveles de adiponectina en LCR brinden información acerca del estado fisiológico del SNC.

5. Hipótesis

Si la adiponectina actúa como hormona reguladora del InsR en órganos periféricos, entonces la inyección de esta hormona en bulbo olfatorio o hipocampo influirá en el contenido del InsR en estas estructuras cerebrales.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar si la inyección de adiponectina en el hipocampo o bulbo olfatorio de la rata, tiene efecto sobre el contenido del InsR en estas regiones cerebrales.

6.2 Objetivos particulares

1. Estudiar la presencia de los receptores AdipoR1 y AdipoR2 en bulbo olfatorio e hipocampo de la rata.
2. Evaluar el efecto de la inyección de 1µg de adiponectina en bulbo olfatorio o hipocampo sobre el contenido del InsR en estas regiones cerebrales.
3. Analizar los posibles cambios en la distribución del InsR en bulbo olfatorio e hipocampo después del tratamiento con adiponectina.

7. Metodología

7.1 Animales

Este estudio se realizó con los requisitos de la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki, bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones Técnicas de Reproducción Animal, Cuidado y Manejo de laboratorio" para minimizar el sufrimiento animal. Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar (250-300 g) que estuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 hrs (luces encendidas a las 07:00 am), a las cuales se les proporcionó agua y comida *ad libitum*.

7.2 Determinación de la dosis para los tratamientos con adiponectina

Se hicieron ensayos dosis-respuesta para determinar mediante Western blot cuál es la dosis a la que se obtenía la mayor cantidad del InsR. Este fue evaluado solo en hipocampo después de la inyección de adiponectina sobre el mismo hipocampo de las ratas. Las cantidades utilizadas fueron 0.5µg, 1µg y 2µg, y se evaluó el contenido del InsR 72 hrs después de los tratamientos comparados con animales control que recibieron solución salina isotónica (SS). Este ensayo se hizo por triplicado.

7.3 Inyecciones de adiponectina en bulbo olfatorio e hipocampo

Cuatro grupos de animales (n=6) fueron anestesiados con ketamina-xilazina (1mL/kg) y se colocaron en un aparato estereotáxico (KOPF Mod 5000, Tujunga CA. EE.UU.) recibiendo una sola inyección de SS (1µL) o adiponectina (1µg/µL), (R&D 1065-AP-050), usando una jeringa Hamilton de 5µL directamente al bulbo

olfatorio (+7,1 mm anteroposterior, \pm 1,5 mm lateral desde el punto Bregma, -4.0mm dorsoventral desde la superficie del cráneo), o a la región CA1 del hipocampo (-3,6 mm anteroposterior, \pm 2,0 mm lateral desde Bregma, -2,8 mm dorsoventral desde la superficie del cráneo), según el Atlas de Paxinos y Watson (1998).

7.4 Inmunofluorescencia para AdipoR1, AdipoR2 e InsR

Los animales (n=6/grupo) fueron anestesiados bajo sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg IP) y luego perfundidos transcardialmente con 200 mL de solución salina tamponada con fosfatos (PBS) (pH=7.4, 4°C) seguido de 250 mL de paraformaldehído al 4% en PBS 0,1M para fijación. Los cerebros fueron retirados y almacenados durante toda la noche en la misma solución de fijación usada para la perfusión (4°C), deshidratados y embebidos en parafina. Secciones coronales (5 μ m) tanto de bulbo olfatorio como de hipocampo se obtuvieron con micrótopo (Leica RM2235) y fueron montados en portaobjetos de vidrio. La parafina fue removida de los cortes y se recuperaron los antígenos con solución de citratos en una cámara eléctrica (Biocare Medical, Concord, CA, EE.UU.) durante 5 min.

Se usaron los anticuerpos anti-AdipoR1 (Santa Cruz sc-46748), anti-AdipoR2 (Santa Cruz sc-99187) y anti-receptor de insulina subunidad β (β -InsR) (Millipore 05-1104). La unión de los anticuerpos se visualizó usando reactivos secundarios de detección Alexa Fluor (Life Technologies). Los cortes fueron examinados bajo microscopio (Leica DM1000) a un objetivo 40x. La detección de inmunofluorescencia en el bulbo olfatorio se hizo en las capas de células

periglomerulares, mitrales y granulosas, en el hipocampo en las regiones CA1, CA3 y giro dentado.

7.5 Extracción de proteínas y Western blot

Los ensayos de Western blot del AdipoR1, AdipoR2 o InsR se llevaron a cabo con tejido fresco de bulbo olfatorio e hipocampo; las muestras se homogeneizaron en tampón de lisis RIPA modificado complementado con inhibidores de proteasas (Roche 11697498001) y fosfatasas (Roche 04906845001). Las proteínas se obtuvieron por centrifugación durante 15 min a 15 000 rpm 4°C y se cuantificaron con el Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce 23235). 60µg de proteínas totales se separaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 10%. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore Merck ISEQ00010) a 20V a temperatura ambiente durante 60 min. Las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo al 5% diluida en una solución salina tamponada con Tris y 0,01% de Tween-20 (TBST); se incubaron a 4°C durante la noche con el anticuerpo anti-InsR-β diluido 1:1000 (Millipore 05-1104) o anti-actina policlonal de cabra diluido 1: 10000 (Santa Cruz sc-1616) como control de carga. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con TBST y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-ratón para el InsR-β (Santa Cruz sc-2005) o anti-cabra para la actina (Santa Cruz sc-2768) conjugados con peroxidasa de rábano diluidos 1:10000.

Para la detección del AdipoR1 y AdipoR2 en bulbo olfatorio de ratas intactas (n=6) se usaron los anticuerpos descritos anteriormente siguiendo el protocolo de

Western blot. Se utilizó el anticuerpo anti-GAPDH (Sigma G8795) como control de carga.

Las bandas inmunorreactivas en las membranas se detectaron mediante reactivo de quimioluminiscencia (Millipore WBLUF0500) en película de alta sensibilidad (Amersham 28-9068-39). Las bandas se analizaron con el programa de análisis MCID Software (Interfocus, Imaging LTD). La densidad óptica relativa de cada banda de diferentes anticuerpos primarios se normalizó contra su control de carga. Los valores de la densidad óptica relativa están en unidades arbitrarias.

Se analizaron de forma separada los valores obtenidos de los bulbos olfatorios del lado izquierdo (LOB), del derecho (ROB), de los hipocampos izquierdos (LHIPP) y derechos (RHIPP); al no existir diferencias en el contenido del InsR como efecto de la lateralización de los tratamientos, se incluyeron las estructuras por tratamiento y se analizaron en forma grupal.

7.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El RNA total fue extraído de los bulbos olfatorios e hipocampos de ratas intactas (n=6) utilizando Trizol (Invitrogen 15596-018) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Un fragmento tanto de músculo gastrocnemio como de hígado se utilizaron como controles positivos para el mRNA del AdipoR1 y AdipoR2 respectivamente. La integridad del RNA se comprobó con una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con colorante GelRed (Biotium 41003); la concentración y pureza se valoraron espectrofotométricamente en una relación a 260 y 280 nm.

Todas las muestras de RNA fueron tratadas con el kit DNA-free (Ambion AM1906) para evitar la contaminación con DNA genómico. 5µg de RNA fueron retro-

transcritos mediante el uso de cebadores oligo-hexámeros en un volumen final de 20µl utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific K1622) de acuerdo con la instrucción del fabricante. El cDNA resultante de la retrotranscripción se amplificó mediante PCR (Thermo Scientific K0251) utilizando 500ng de muestra tanto de bulbo olfatorio como de hipocampo con los siguientes cebadores específicos durante 40 ciclos:

AdipoR1 5'CCACCATGCACTTTACTATC3'forward y

5'TACTCTGACCTTGGTATACAG3'reverse;

AdipoR2 5'TGACATCTGGTTTCACTTTC3'forward y

5'AGTACTTTGCTTTAAGGACG3'reverse.

Cada muestra se corrió por duplicado. Los productos de PCR se separaron y visualizaron en un gel de agarosa al 2% con tinción de RedGel.

7.7 Análisis estadístico

Los valores obtenidos están expresados como la media \pm error estándar (SEM). Se realizó una prueba estadística t-Student para comparar el contenido del AdipoR1 vs AdipoR2 tanto en bulbo olfatorio como en hipocampo. Se hizo una prueba Mann-Whitney de dos colas para comparar el contenido del InsR entre los grupos control vs los grupos que recibieron adiponectina. Los datos fueron analizados utilizando el Software de Estadística Prism versión 5.01 (GraphPad, San Diego, CA). El valor $p \leq 0,05$ fue considerado como significativo en todos los casos.

8. Resultados

8.1 AdipoR1 y AdipoR2 se expresan en el bulbo olfatorio de la rata

Por medio de inmunofluorescencia se muestra la presencia del AdipoR1 y AdipoR2 en el bulbo olfatorio. AdipoR1 se encuentra en la capa de células periglomerulares, mitrales y granulosas; existe un patrón diferencial de tinción, las células periglomerulares y las granulosas presentan una intensa marca, mientras que no ocurre de esa forma en la capa de células mitrales (Figura 9).

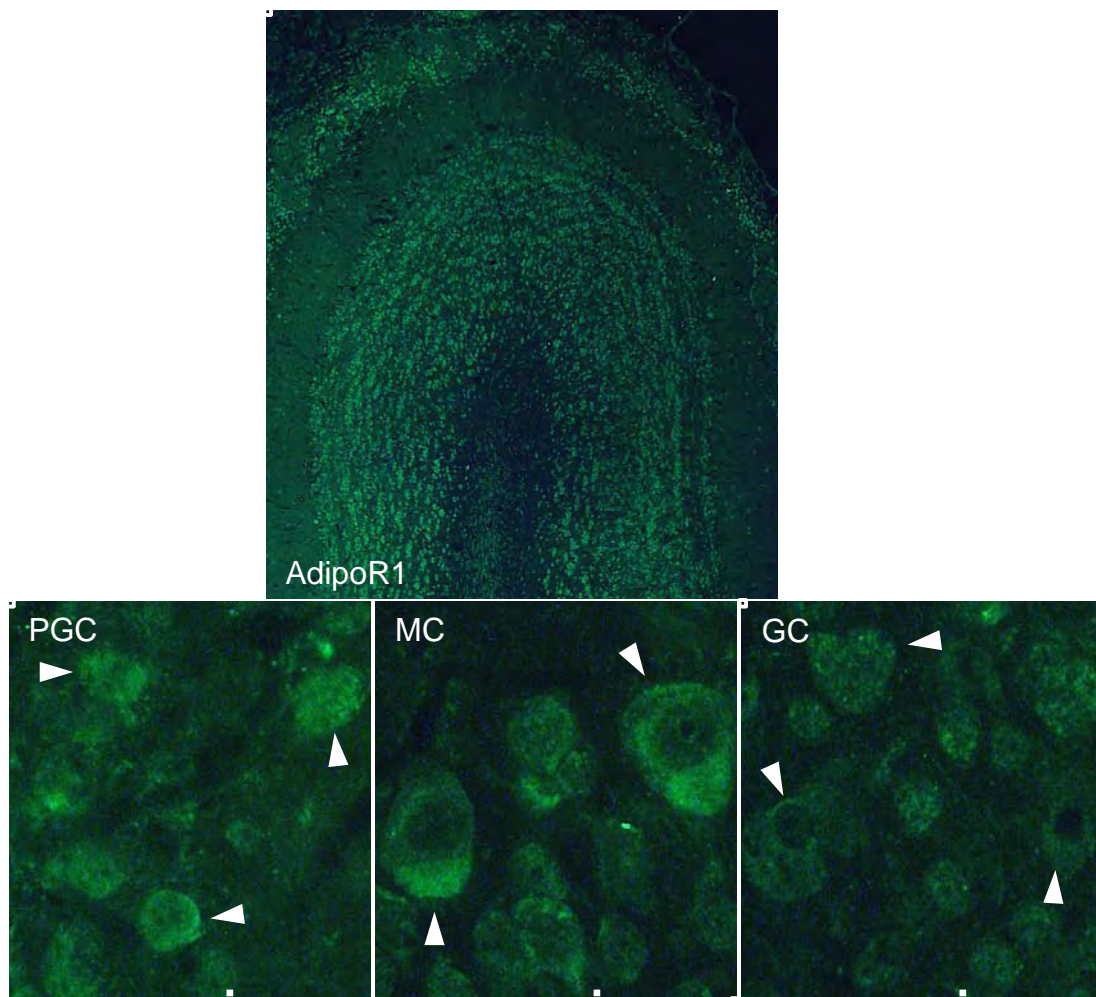


Figura 9. Microfotografía de bulbo olfatorio que muestra inmunofluorescencia para el AdipoR1. Los punteros indican la marca sobre la capa de células periglomerulares (PGC), mitrales (MC) y granulosas (GC). La barra de calibración es de 50µm.

También, el AdipoR2 está presente en las capas de células periglomerulares, mitrales y granulosas. A diferencia con lo que ocurre con el AdipoR1, este receptor tiene intensa marca en la capa de células mitrales, mientras que para capas de células periglomerulares y granulosas, la tinción es menos intensa (Figura 10).

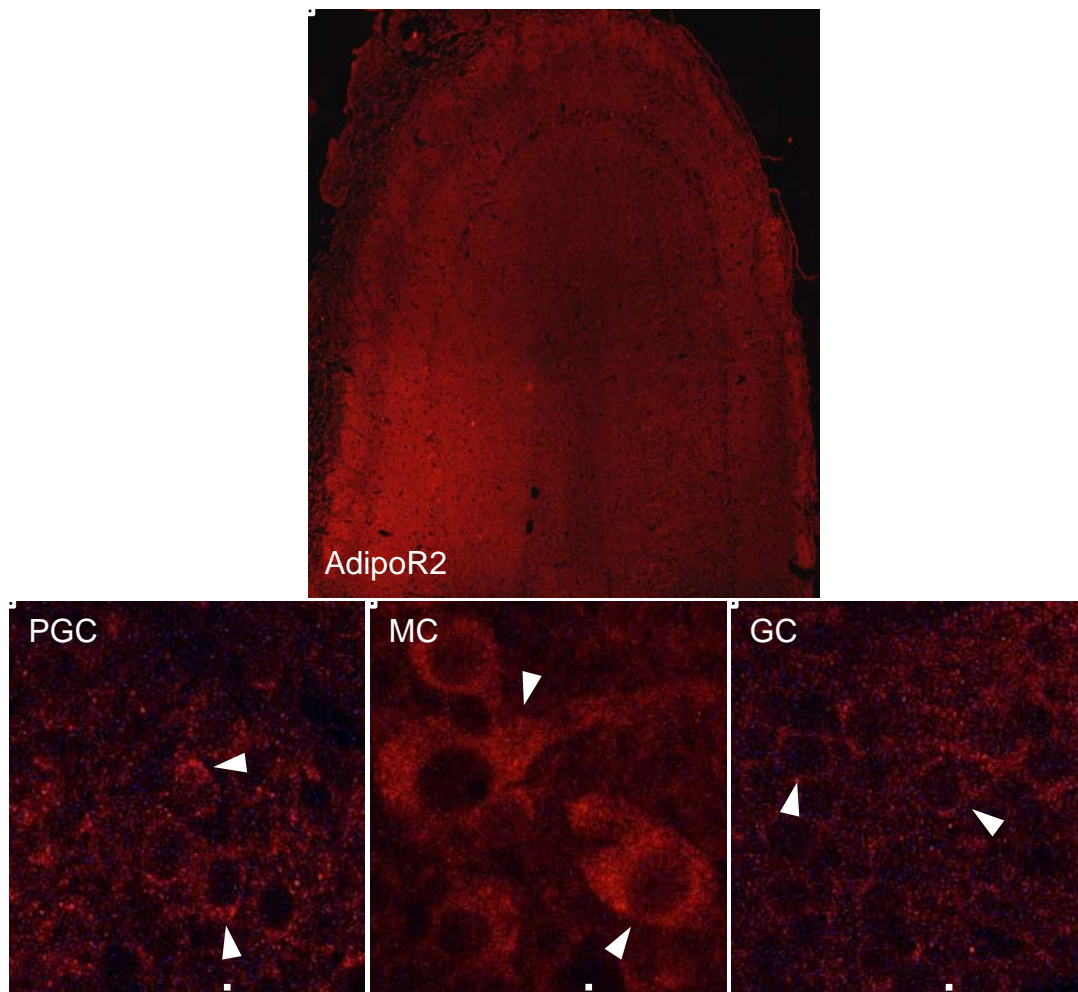


Figura 10. Microfotografía de bulbo olfatorio que muestra inmunofluorescencia para el AdipoR2. Los punteros indican la marca sobre la capa de células periglomerulares (PGC), mitrales (MC) y granulosas (GC). La barra de calibración es de 50µm.

Mediante PCR se comprobó que los transcritos del mRNA presentes en bulbo olfatorio corresponden a los que se encuentran en el músculo esquelético para el AdipoR1 e hígado para el AdipoR2 (Figura 11A). La expresión proteica de ambos AdipoR's en bulbo olfatorio fue evaluado mediante Western blot (Figura 11B), donde se encontraron diferencias significativas entre el contenido del AdipoR1 vs AdipoR2 en bulbo olfatorio, $p=0,001$ (Figura 11C)

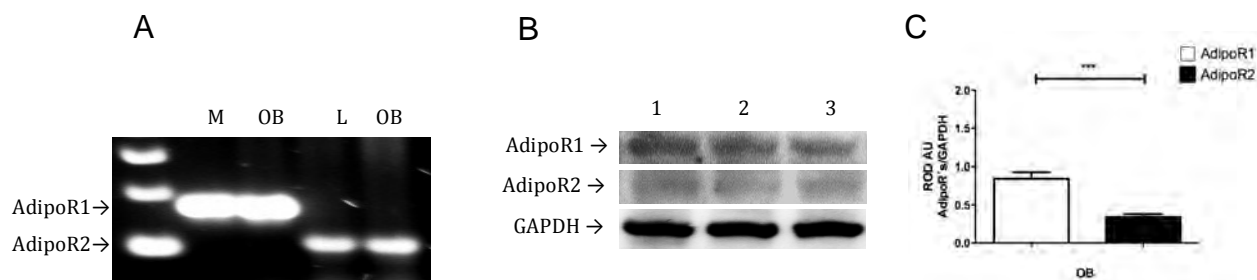


Figura 11. Imagen representativa de PCR mostrando que el mRNA del AdipoR1 presente bulbo olfatorio es el mismo que se encuentra en músculo esquelético; el mRNA del AdipoR2 existente en bulbo olfatorio corresponde al que se encuentra en hígado (A). Imagen de Western blot (B) y gráfico (C) que muestran el contenido del AdipoR1 (blanco) vs el AdipoR2 (negro) en bulbo olfatorio de la rata. Se utilizó GAPDH como control de carga. $p=0,001$

8.2 AdipoR1 y AdipoR2 se expresan en el hipocampo de la rata

Del mismo modo, la inmunofluorescencia reveló tinción para los AdipoR's en el hipocampo de la rata. El AdipoR1 es abundante en el hipocampo. En detalle, se observa su presencia en las células piramidales de CA1 y CA3, así como en células granulares de giro dentado. La tinción se presenta tanto en la membrana celular como en el citoplasma (Figura 12).

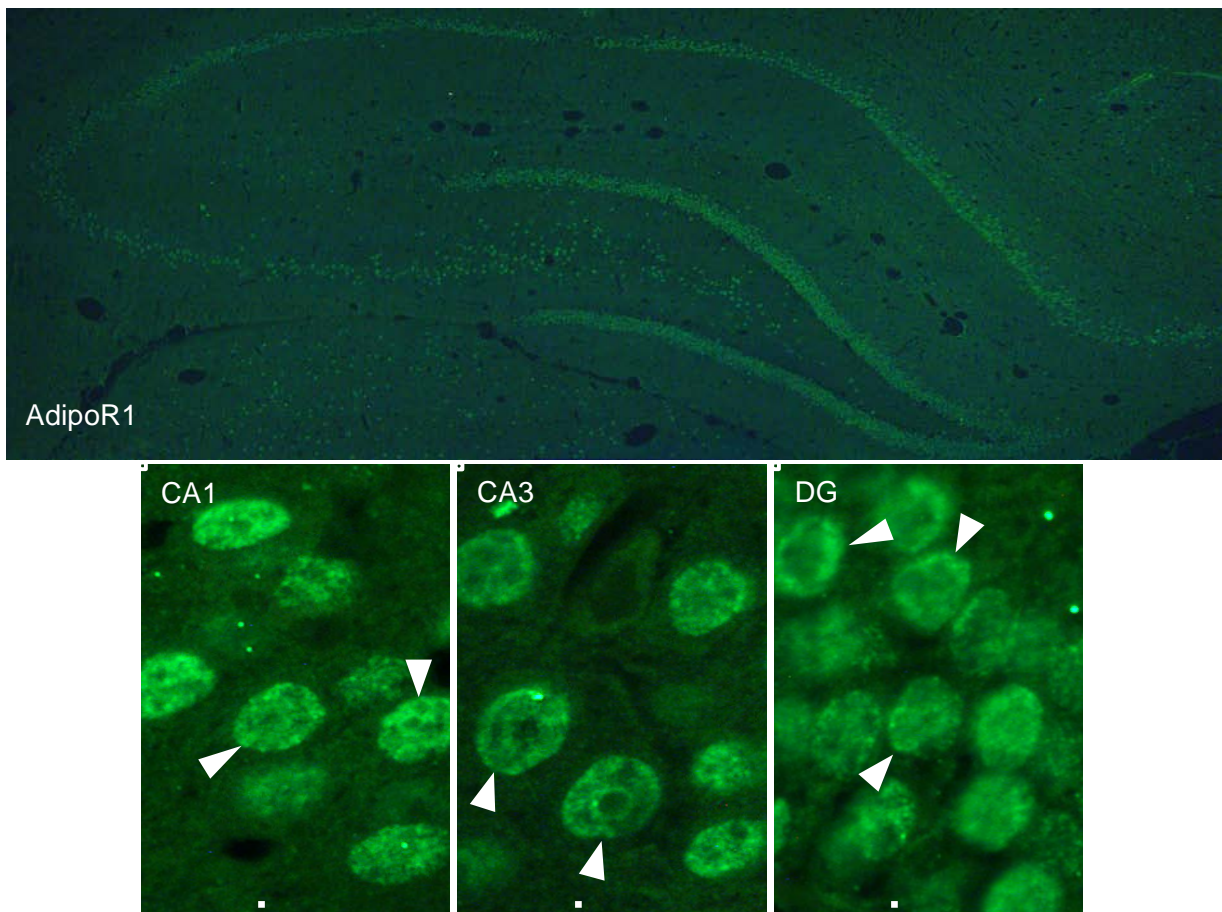


Figura 12. Microfotografía coronal del hipocampo que muestra inmunofluorescencia para el AdipoR1. Los punteros indican la marca sobre las células piramidales de CA1 y CA3, así como de las células granulares de giro dentado. La barra de calibración es de 50µm.

Por otro lado, el AdipoR2 se encuentra localizado únicamente en las membranas de las células piramidales de CA1 y CA3 pero existe fuerte tinción membranal y citoplasmática en las células granulares de giro dentado (Figura 13).

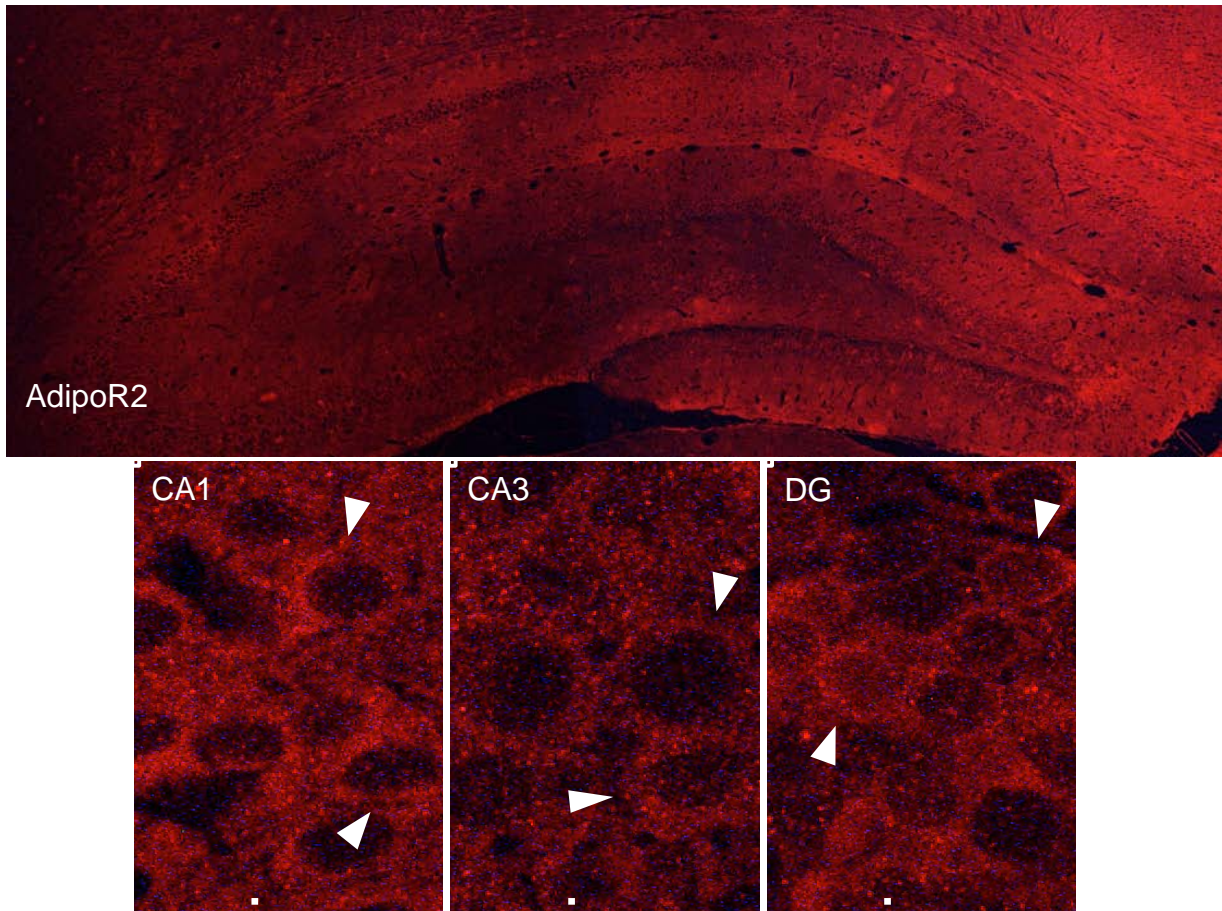


Figura 13. Microfotografía coronal del hipocampo que muestra inmunofluorescencia para el AdipoR2. Los punteros indican la marca sobre las células piramidales de CA1 y CA3, así como de las células granulares de giro dentado. La barra de calibración es de 50µm.

El mRNA del AdipoR1 y AdipoR2 que se encuentra en el hipocampo corresponde al que está presente en músculo esquelético e hígado, respectivamente. Mediante Western blot se pudo observar la tendencia de un mayor contenido del AdipoR1

en comparación al AdipoR2, al hacer el análisis estadístico no se observaron diferencias significativas en el contenido entre ambos receptores (Figura 14).

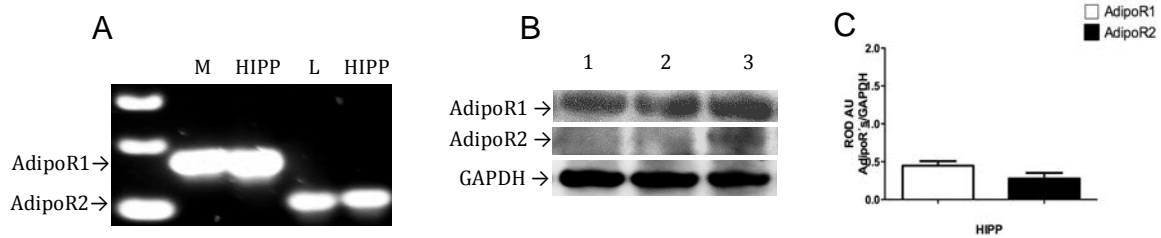


Figura 14. Imagen representativa de PCR mostrando que el mRNA del AdipoR1 presente en el hipocampo es el mismo que se encuentra en músculo esquelético; el mRNA del AdipoR2 corresponde al que se encuentra en hígado (A). Imagen de Western blot (B) y gráfico (C) que muestran el contenido del AdipoR1 (blanco) vs el AdipoR2 (negro) en el hipocampo de la rat. Se utilizó GAPDH como control de carga.

Para las imágenes de inmunofluorescencia se utilizaron cortes de hipotálamo como controles positivos para el AdipoR1 y AdipoR2, mientras que los controles negativos no revelaron tinción (Figura 15).

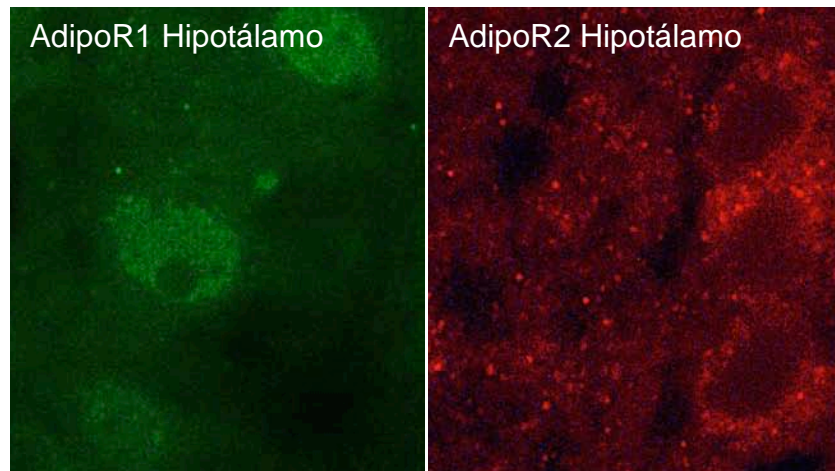


Figura 15. Microfotografías del hipotálamo que muestran las marcas para el AdipoR1 y el AdipoR2 respectivamente; estos cortes se utilizaron como controles positivos.

8.3 Determinación de la dosis para los tratamientos con adiponectina

Mediante Western blot se evaluó el mayor contenido del InsR en el hipocampo como respuesta a dosis de adiponectina de 0.5 μ g, 1.0 μ g y 2.0 μ g comparados con SS. Los hipocampos fueron obtenidos 72 hrs después de la administración de los tratamientos. La cantidad de adiponectina que presentó mejor respuesta fue 1 μ g. (Figura 16).

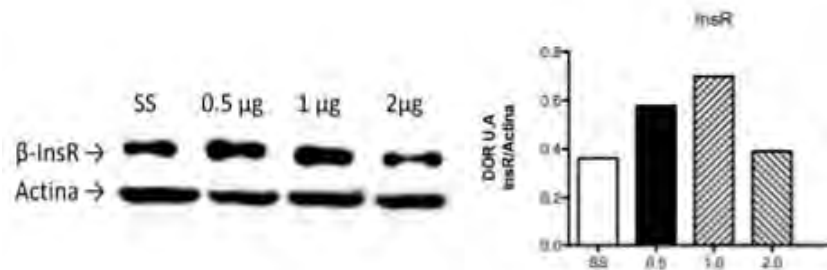


Figura 16. Imagen representativa de Western blot y el gráfico que muestra los valores del contenido del InsR después de la inyección de diferentes dosis de adiponectina en hipocampo. Los tejidos se obtuvieron 72 hrs después de la administración de los tratamientos. Se utilizó actina como control de carga.

8.4 Efecto de la inyección de adiponectina en el bulbo olfatorio sobre el contenido del InsR en bulbo olfatorio e hipocampo

Se analizó el efecto de la inyección de adiponectina dirigida a bulbo olfatorio sobre la expresión de InsR en el mismo bulbo olfatorio y en el hipocampo. La figura 17 muestra la trayectoria de la inyección de los tratamientos hacia el bulbo olfatorio.

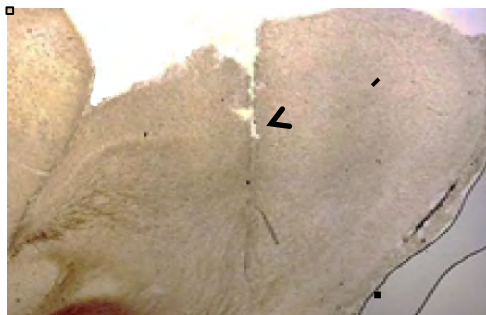


Figura 17. Corte sagital de bulbo olfatorio indicando el sitio donde se administraron los tratamientos de adiponectina. La barra de calibración es de 500 μ m.

Se evaluó por separado el contenido de InsR presente en el bulbo olfatorio izquierdo (LOB) y derecho (ROB) así como del hipocampo izquierdo (LHIPP) y derecho (RHIPP). Se analizaron los datos de 6 animales por grupo (Figura 18).

No se observaron diferencias significativas en el contenido del InsR como consecuencia de la lateralización de los tratamientos, por lo que fueron agrupados para considerar ratas control vs ratas tratadas con adiponectina. Se observó una tendencia de disminución en el contenido de InsR en el bulbo olfatorio de las ratas inyectadas con adiponectina en comparación con los animales controles. Por otra parte, observamos una tendencia de aumento en la cantidad de InsR en el hipocampo de ratas inyectadas con adiponectina en bulbo olfatorio (Figura 18). En ambos casos no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

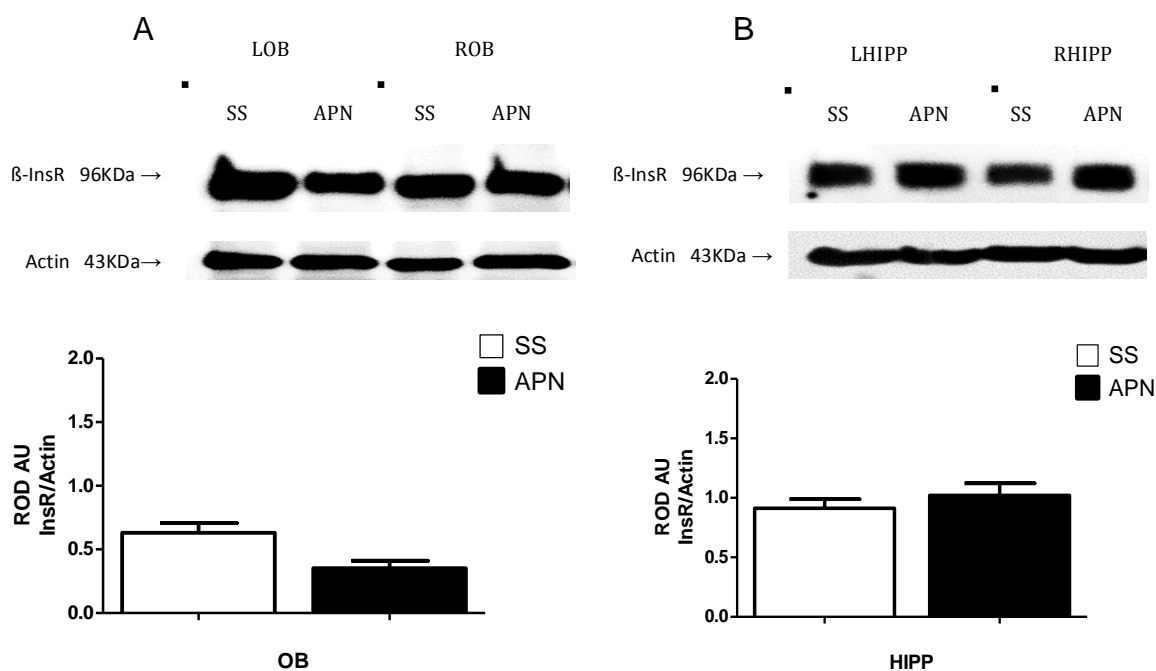


Figura 18. Imágenes representativas de Western blot del InsR en bulbo olfatorio (A) e hipocampo (B) después de la inyección de adiponectina en el bulbo olfatorio. También se evaluó el efecto de la lateralización de los tratamientos comparando bulbos izquierdos (LOB) contra bulbos derechos (ROB) así como hipocampos izquierdos (LHIPP) contra hipocampos derechos (RHIPP) Las barras blancas corresponden a los animales control, las barras negras corresponden a los animales que recibieron APN. Se utilizó actina como control de carga.

8.5. Efecto de la inyección de adiponectina en el hipocampo sobre el contenido del InsR de bulbo olfatorio

También, se evaluó el contenido del InsR en el bulbo olfatorio e hipocampo después de la inyección de adiponectina en la región hipocampal. La figura 19 muestra la trayectoria de las inyecciones dirigidas a la región CA1 de hipocampo.



Figura 19. Corte sagital de hipocampo mostrando el sitio donde se administraron los tratamientos de adiponectina. La barra de calibración corresponde a 500 μm .

No se aprecian diferencias significativas en el contenido del InsR como resultado de la lateralización de los tratamientos; en consecuencia, los datos fueron agrupados y se procesaron como grupos controles vs adiponectina.

En el análisis del contenido del InsR en bulbo olfatorio después de la inyección de adiponectina en el hipocampo, se puede observar un mayor contenido del InsR en el grupo tratado con adiponectina comparado con el grupo de los animales control ($p= 0.04$) (Figura 20).

Observando el incremento del InsR en el bulbo olfatorio, nuestro interés fue analizar la distribución de InsR en diferentes grupos celulares de bulbo olfatorio después de los tratamientos de adiponectina en el hipocampo. El análisis histológico de bulbo olfatorio nos muestra que en la capa de células periglomerulares hay más células InsR positivas en las ratas tratadas con adiponectina en comparación con las ratas control (Figura 21, arriba).

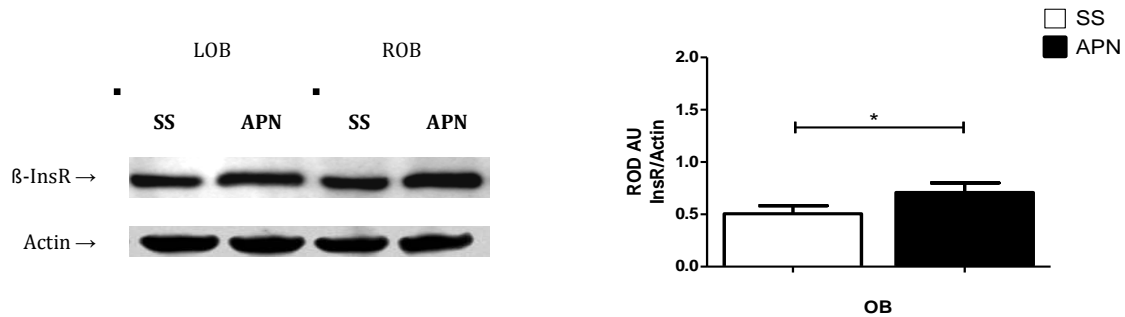


Figura 20. Imagen representativa de Western blot del InsR en bulbo olfatorio después de la inyección de adiponectina en el hipocampo. No se aprecian cambios como efecto de la lateralización de los tratamientos comparando bulbos izquierdos (LOB) contra bulbos derechos (ROB). Existe un mayor contenido del InsR en los animales tratados con adiponectina comparados con los animales control. $p=0.04$. La barra blanca corresponde a los animales control, la barra negra corresponde a los animales que recibieron APN. Se utilizó actina como control de carga.

La capa de células mitrales en las ratas tratadas con adiponectina mostraron más células positivas al InsR con intensa inmunofluorescencia en el citoplasma mientras que la capa de células mitrales de los animales control muestran un menor número de células marcadas y tinción basal en la membrana celular (Figura 21 medio). Asimismo, en la capa de células granulosas podemos ver que hay una marca más fuerte de las membranas celulares y la presencia de marca citoplasmática en animales que recibieron inyección de adiponectina en comparación con los controles (Figura 21 abajo).

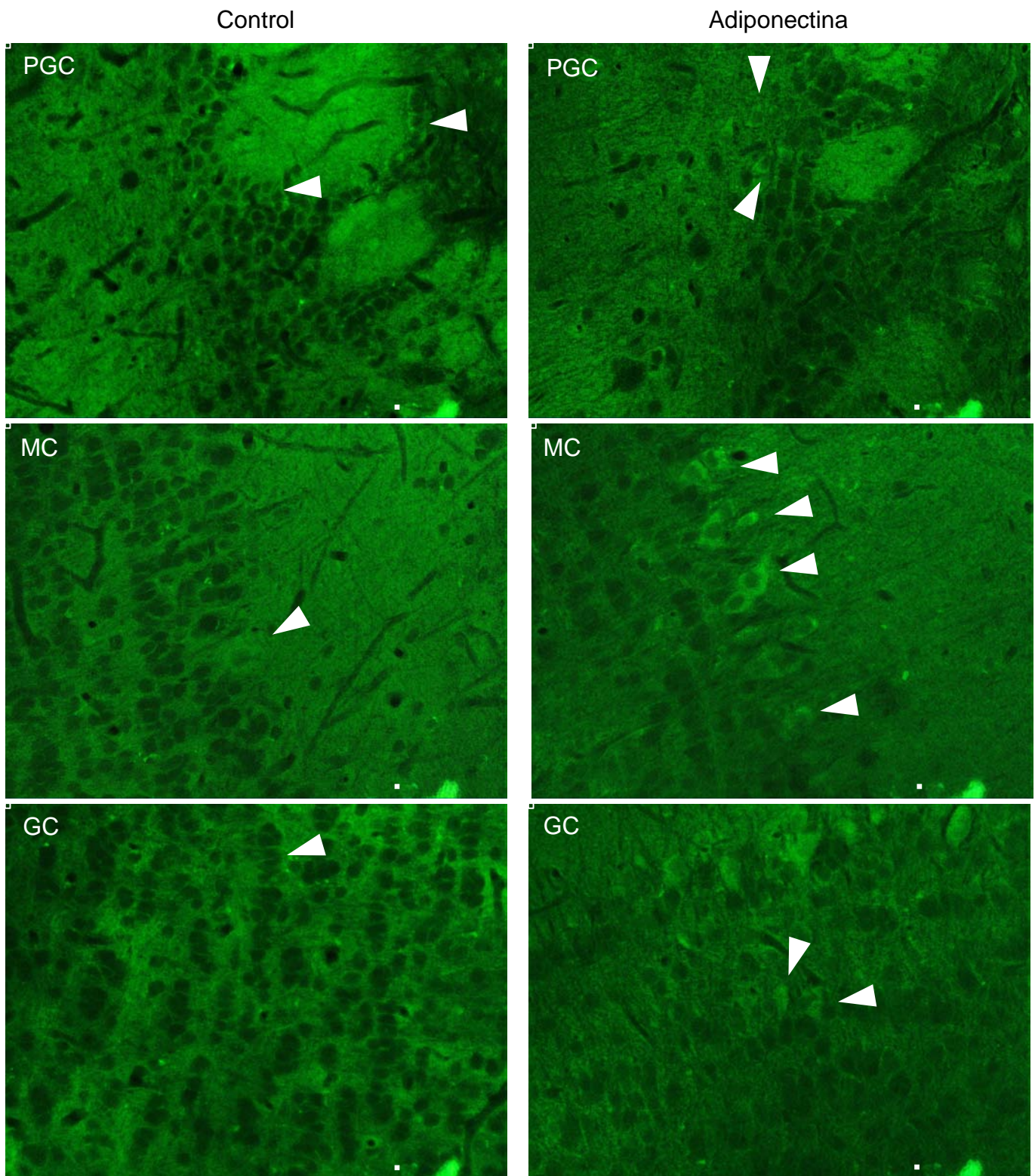


Figura 21. Inmunofluorescencia del InsR en bulbo olfatorio. Se aprecia mayor reactividad en las capas de células periglomerulares (PGC), mitrales (MC) y granulosas (GC) de los animales tratados con adiponectina comparados con los controles. La barra de escala corresponde a 50µm.

8.6 Efecto de la inyección de adiponectina en el hipocampo sobre el contenido del InsR de hipocampo

Se analizó la cantidad del InsR en el hipocampo, mismo donde se inyectaron los tratamientos. Se observa una tendencia de incremento en el contenido del InsR sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y con adiponectina (Figura 22).

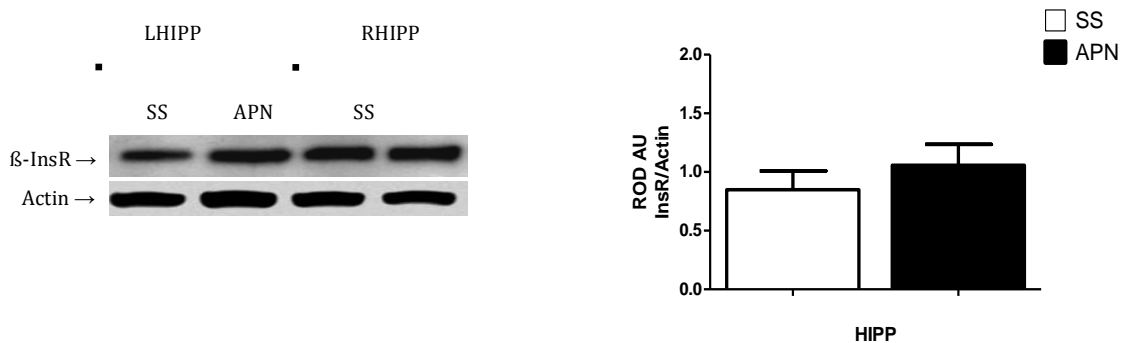


Figura 22. Imagen representativa de Western blot del InsR en hipocampo después de la inyección de adiponectina en el hipocampo. No se aprecian cambios como efecto de la lateralización de los tratamientos comparando hipocampos izquierdos (LHIPP) contra hipocampos derechos (RHIPP), ni como efecto de los tratamientos. La barra blanca corresponde a los animales control, la barra negra corresponde a los animales que recibieron APN. Se utilizó actina como control de carga.

Las imágenes de inmunofluorescencia del hipocampo muestran mayor reactividad en las células piramidales de la región CA1 de las ratas con adiponectina vs animales control (Figura 23 arriba). Del mismo modo, la región CA3 muestra un mayor número de células positivas al InsR, después de la inyección adiponectina (Figura 23 medio). Finalmente, en el giro dentado, las células granulares de los animales de control sólo muestran tinción en la membrana celular, en contraste, las ratas tratadas con adiponectina presentan intensa marca citoplasmática (Figura 23 abajo).

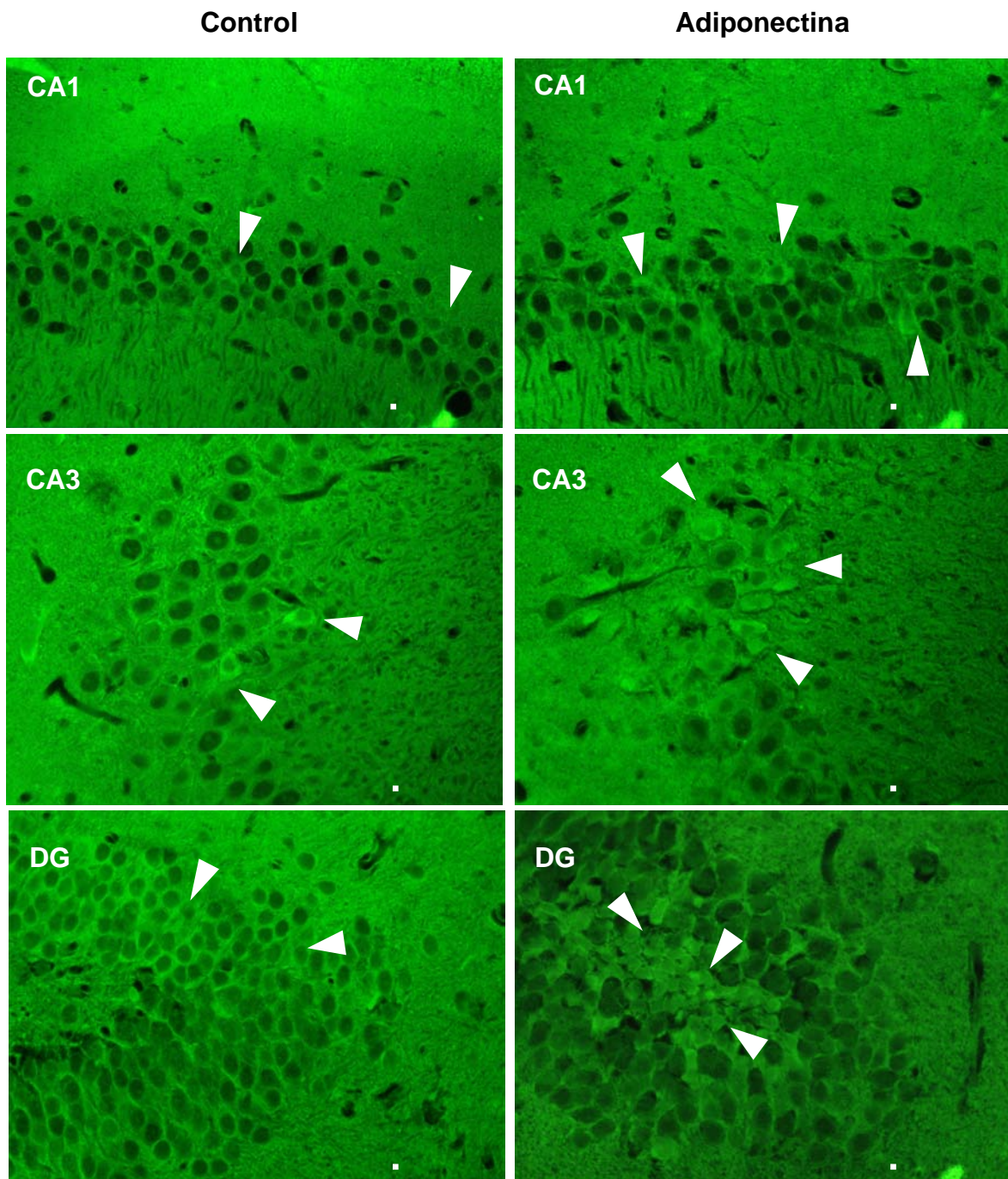


Figura 23. Inmunofluorescencia del InsR en hipocampo. Se aprecia mayor reactividad en las células piramidales de CA1 (arriba) y CA3 (medio) y granulosas (GC) de los animales tratados con adiponectina comparados con los controles. Los punteros señalan la fluorescencia. La barra de escala corresponde a 50µm.

9. Discusión

En nuestro conocimiento, ésta es la primera descripción del patrón de distribución regional de AdipoR1 y AdipoR2 en el bulbo olfatorio e hipocampo del cerebro de rata Wistar.

Los datos obtenidos muestran la presencia del AdipoR1 y AdipoR2 en las tres capas principales del bulbo olfatorio: periglomerular, mitral y granulosa, y en las regiones CA1, CA2, CA3 y giro dentado del hipocampo; en éstas estructuras cerebrales también se ha reportado abundante presencia de los InsR (Baskin et al., 1983; Hill et al, 1986; Werther et al., 1987; Marks et al. 1990; Matsumoto y Rhoads, 1990; Gupta et al., 1992). La presencia del InsR y los AdipoR's en las mismas regiones del SNC sugiere interacción entre las vías de señalización de la adiponectina y la insulina en el cerebro de forma similar a lo que ocurre en tejidos periféricos.

Se pudo observar que existe una distribución particular de los AdipoR's dentro del bulbo olfatorio, mientras que el AdipoR1 está localizado en las capas periglomerular y granulosa, el AdipoR2 tiene expresión en la capa de células mitrales. En el hipocampo pudimos observar que se expresan ambos AdipoR's de manera diferencial: las células piramidales de CA1, CA3 y las células granulares del giro dentado tienen fuerte tinción para el AdipoR1, mientras el AdipoR2 se localiza principalmente en las células granulares de giro dentado.

Tanto en bulbo olfatorio como en hipocampo encontramos un mayor contenido del AdipoR1 respecto al AdipoR2. Este dato sugiere que la actividad que la adiponectina genera en bulbo olfatorio e hipocampo cursa en su mayoría por el

AdipoR1, y que la señalización de la adiponectina a través del AdipoR2 es puntual en las células mitrales del bulbo olfatorio y granulares del giro dentado.

La presencia de AdipoR1 fue descrita en el epitelio olfatorio de los ratones, sugiriendo una posible actividad moduladora de la adiponectina sobre el sistema olfatorio en relación a la adquisición de alimento y al balance de energía (Haas et al., 2008). Se ha demostrado que pre-tratamientos con adiponectina generan una mayor respuesta eléctrica en células del epitelio olfatorio tras la estimulación a un olor determinado y una actividad superior de las células periglomerulares, aunque no se ha definido si esta última corresponde a mayor actividad del epitelio olfatorio o es como respuesta a la actividad directa de la adiponectina (Loch et al., 2013). No se encontraron a los AdipoR's en las neuronas del órgano vomeronasal, que se especializa en la detección de feromonas y está implicado en la mediación de conductas sociales, lo que centra aún más el posible papel de la adiponectina en conductas alimentarias (Loch et al., 2013).

Guthoff y colaboradores (2011) encontraron una variación genética en la región promotora para la expresión del AdipoR1 asociado con una disminución de reconocimiento olfatorio en sujetos humanos sanos. Estas alteraciones se evaluaron considerando que los niveles plasmáticos de adiponectina no tuvieran variaciones importantes entre los sujetos de estudio e influyeran en el reconocimiento de olores.

El sistema olfatorio está estrechamente vinculado con el sistema endócrino; en esencia, el sistema olfatorio puede servir como sensor interno del estado químico o nutricional de los individuos (Palouzier-Paulignan et al, 2012). Cuando los

animales detectan el olor del alimento, se ha observado un aumento de la actividad eléctrica de las células mitrales (Pager et al., 1972). Se sabe que cuando los animales están en ayuno, se incrementan los niveles circulantes de adiponectina y esto podría modular la información olfatoria para que llegue a estructuras cerebrales centrales como el hipotálamo, donde se localizan grupos neuronales que regulan el hambre y la saciedad, y que también contienen a los AdipoR's (Hoyda y Ferguson, 2010). Es conocido que la adiponectina participa en vías de señalización neuronales que controlan la homeostasis de la energía de activación hipotálamo (Qi et al., 2004), como una hormona orexigénica, estimulando la ingesta de alimentos, suprimiendo el gasto de energía y promoviendo el almacenamiento de grasa (Kubota et al., 2007).

El hecho de encontrar una expresión diferencial del AdipoR1 y AdipoR2 en las tres capas celulares principales del bulbo olfatorio podría estar relacionado con el papel que estos tipos de células desempeñan en el sistema olfatorio en el comportamiento alimentario. Shepherd et al. en 2004 describieron que el 80% de los contactos sinápticos con las células granulares son bidireccionales, las conexiones mitrales-granulosas son excitatorias y las granulosas-mitrales son inhibitorias; en ese sentido, aún es desconocido si la actividad de la adiponectina tiene que ver con los procesos sinápticos que ocurren en el bulbo olfatorio o su participación se centra en los procesos de olfacción, ingesta de alimento y regulación de energía que han sido descritos.

Por otro lado, hay reportes de la expresión del AdipoR1 y AdipoR2 en las células endoteliales del hipocampo (Jeon et al., 2009) y cultivos celulares primarios de

hipocampo (Qui et al.; Zhang et al., 2011). Se ha demostrado que la adiponectina tiene funciones de protección del hipocampo: tiene efectos anti-angiogénicos (Jeon et al., 2009); disminuye procesos proinflamatorios (Chen et al., 2009), confiere protección celular contra las convulsiones inducidas por ácido kaínico (Lee et al., 2011) y también, de forma similar a los efectos que genera la insulina, la adiponectina tiene actividad neurotrófica y antiapoptótica (Zhang et al., 2011; Jung et al., 2006).

A la fecha, no existe una relación directa entre la adiponectina y las funciones de memoria y cognición, pero se ha propuesto que alteraciones en los niveles de adiponectina circulante podrían considerarse como un marcador metabólico de deterioro cognitivo que puede contribuir al desarrollo de trastornos neurodegenerativos incluyendo la EA (Une et al., 2011; Teixeira et al., 2012; Khemka et al., 2014). Sobre este punto, existen discrepancias acerca de la concentración de adiponectina sérica en la EA, mientras que algunos autores proponen que hay disminución otros mencionan un incremento, y estos valores parecen estar más asociados al estado metabólico de los participantes que al deterioro cognitivo.

Es ampliamente conocido que la insulina tiene un papel muy importante en la homeostasis de la glucosa periférica; aunque su señalización en el cerebro aún no está del todo aclarada. La captación de glucosa en el cerebro no está relacionada, en su mayoría con la acción de la insulina, pero se tiene que considerar al cerebro como un órgano sensible a su actividad porque puede modular diferentes y variados procesos celulares dentro del SNC. (Ghasemi et al., 2012). A la fecha, se

ha descrito que la insulina regula en SNC la ingesta de alimentos, tiene influencia en el gasto de energía y el control del peso, participa en mecanismos de reproducción a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. También se le considera como una hormona neuromoduladora y factor neurotrófico, lo que resulta en procesos de proliferación celular, diferenciación y el crecimiento neurítico; estos últimos están estrechamente relacionados con mecanismos moleculares de cognición y la formación de la memoria. El estudio de la señalización de la insulina en cerebro ha sido una importante herramienta para el estudio de neuroprotección contra la apoptosis, el estrés oxidativo, isquemia y enfermedades neurodegenerativas como la EA (Ghasemi et al., 2012).

Se ha demostrado que la insulina es un fuerte modulador en el bulbo olfatorio (Fadool, et al., 2011). El incremento en los niveles de insulina debido a la ingestión de alimentos podría modular la acción de las células mitrales en estrecha relación con el estado energético, funcionando como sensor metabólico. Este vínculo entre el sistema olfatorio y el balance energético debe ser fuerte, dado que la percepción de olores lleva a la selección e ingestión de alimento (Fadool et al., 2011).

Se sabe que la disminución en el contenido cerebral de la insulina, el InsR o alteraciones en su vía de señalización están involucrados con fallas funcionales en las neuronas que dan lugar al deterioro cognitivo (Zhao et al., 1999) En algunas regiones del cerebro, el β -amiloide, un péptido distintivo de la EA, compite con la insulina por la enzima degradadora de insulina (IDE) (Farris et al., 2003). La IDE es una enzima importante en la degradación de la insulina y en el aclaramiento

extracelular de β -amiloide en el cerebro, evitando la acumulación y formación de oligómeros neurotóxicos y placas neuríticas (Reger et al., 2006).

Se ha propuesto que los estados de hiperinsulinemia periférica resultan en deterioro del aclaramiento de β -amiloide cerebral, atrofia de las células piramidales de la región CA1 y alteraciones en las células granulares del giro dentado, incrementando el riesgo de EA (Blázquez et al., 2014). La reducción en el tamaño del hipocampo en estadios tempranos de la EA también está asociada con la pérdida de la capacidad olfatoria, previa al deterioro de la memoria (Kjelvik et al., 2014); de este modo, el deterioro en la identificación de olores podría ser un marcador temprano de degeneración neuronal. La disminución del olfato puede conducir a un deterioro significativo de la calidad de vida, incluyendo la alteración del gusto y pérdida del placer por comer, dando lugar a cambios en el peso, y la dificultad de evitar riesgos para la salud tales como situaciones de peligro o alimentos en mal estado (Gaines et al., 2010).

Las alteraciones metabólicas con frecuencia complican el curso de los trastornos neurodegenerativos. Se ha visto una pérdida de peso y un menor índice de masa corporal en pacientes con EA de edad avanzada comparado con el de sujetos sanos de la misma edad y existe un nivel elevado de adiponectina en el mismo período (Une et al., 2010; Aziz et al, 2008), sustentando que la adiponectina tiene alta participación en la homeostasis de energía y el control del peso corporal actuando sobre el hipotálamo (Kubota et al., 2007).

Finalmente, para examinar los efectos puntuales de adiponectina en el SNC, es necesario llevar a cabo más estudios, porque su participación en los procesos cerebrales y la posible relación con la actividad neuronal aún no están claros.

10. Conclusiones

En el presente estudio hemos demostrado que los receptores de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2, se expresan de forma diferencial en las capas de células periglomerulares, mitrales y granulosas del bulbo olfatorio, también en las regiones CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo en el cerebro de la rata.

Nuestros datos apuntan a que la adiponectina regula en forma específica el contenido del InsR dentro del bulbo olfatorio, y en consecuencia, estaría influyendo en la actividad que las células periglomerulares, mitrales y granulosas desempeñan en el sistema olfatorio, como regular la conducta de alimentación y controlando la percepción sensorial de los alimentos.

Por otro lado, es muy posible que en el hipocampo, hormonas involucradas estrechamente en el metabolismo como la adiponectina e insulina, desencadenen respuestas cerebrales que poco o nada tengan que ver con el metabolismo neuronal o glial. En ese sentido la participación de la adiponectina en las diferentes regiones del cerebro aún no es clara; al ser una hormona pleiotrópica y participando en diferentes respuestas celulares, se requieren más experimentos para conocer sus mecanismos de acción precisos en SNC.

11. Literatura citada

1. Achari A. E., Jain S. K. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction *Int J Mol Sci.* 2017 Jun; 18(6): 1321.
2. Acosta-Martínez M. 2011. PI3K: an attractive candidate for the central integration of metabolism and reproduction. *Front Endocrinol.* 2: 110
3. Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, Jackson MB, Scherer PE. 2006. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes.* 55 Suppl 2: S145-54
4. Ahima RS. 2005. Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol Metab.* 16 (7): 307-13
5. Ajuwon KM, Spurlock ME. 2005. Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288 (5): R1220-5
6. Aradillas E, Libon DJ, Schwartzman RJ. 2011. Acute loss of spatial navigational skills in a case of a right posterior hippocampus stroke. *J Neurol Sci.* 308:144–146
7. Aziz NA, van der Marck MA, Pijl H, Olde Rikkert MG, Bloem BR, Roos RA. 2008. Weight loss in neurodegenerative disorders. *J Neurol.* 255 (12): 1872-80
8. Banks W, Owen JB, Erickson MA. 2012. Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacol Ther.* Oct; 136 (1): 82-93
9. Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. 2005. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* No.4. 183-189
10. Baskin DG, Porte D Jr, Guest K, Dorsa DM. 1983. Regional concentrations of insulin in the rat brain. *Endocrinology.* 112:898–903
11. Bear MF. 2008. *Neurociencia: la exploración del cerebro (3ªEd)*, LIPPINCOTT
12. Beck B, Pourié G. 2013. Ghrelin, neuropeptide Y, and other feeding-regulatory peptides active in the hippocampus: role in learning and memory. *Nutr Rev.* 71 (8): 541-61
13. Beinfeld MC, Meyer DK, Brownstein MJ. 1981. Cholecystokinin in the central nervous system. *Peptides.* 2 Suppl 2: 77-9

14. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. 2001. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med.* 7 (8): 947-53
15. Bigl V, Arendt T, Fischer S, Fischer S, Werner M, Arendt A. 1987. The cholinergic system in aging. *Gerontology.* 33; 172-180
16. Bjursell M, Ahnmark A, Bohlooly-Y M, William-Olsson L, Rhedin M, Peng XR, Ploj K, Gerdin AK, Arnerup G, Elmgren A, Berg AL, Oscarsson J, Lindén D. 2007. Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. *Diabetes.* 56 (3): 583-93
17. Blázquez E, Velázquez E, Hurtado-Carneiro V, Ruiz-Albusac JM. 2014. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 5: 161
18. Candeias E, Duarte AI, Carvalho C, Correia SC, Cardoso S, Santos RX, Plácido AI, Perry G, Moreira PI. 2012. The impairment of insulin signaling in Alzheimer's disease. *IUBMB Life.*; 64 (12) :951-7
19. Cayre M, Canoll P, Goldman JE. 2009. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 88; 41–63
20. Chan KH, Lam KS, Cheng OY, Kwan JS, Ho PW, Cheng KK, Chung SK, Ho JW, Guo VY, Xu A. 2012. Adiponectin is protective against oxidative stress induced cytotoxicity in amyloid-beta neurotoxicity. *PLoS One.* 7 (12): e52354
21. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. 2003. Adiponectin: more than just another fat cell hormone?. *Diabetes Care.* 26 (8): 2442-50
22. Chen B, Liao WQ, Xu N, Xu H, Wen JY, Yu CA, Liu XY, Li CL, Zhao SM, Campbell W. 2009. Adiponectin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory action. *Brain Res.* 1273: 129-137
23. Cheng KK, Lam KS, Wang B, Xu A. 2014. Signaling mechanisms underlying the insulin-sensitizing effects of adiponectin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 28 (1): 3-13
24. Christie JM, Wenthold RJ, Monaghan DT. 1999. Insulin Causes a Transient Tyrosine Phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA Receptor Subunits in Rat Hippocampus *J Neurochem*; 72 (4): 1523-8
25. Cleland TA, Linster C. 2005. Computation in the olfactory system. *Chem. Senses* 30, 801–813

26. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. 2001. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest.* 108 (12): 1875-81
27. Craft S, Asthana S, Newcomer JW, Wilkinson CW, Matos IT, Baker LD, Cherrier M, Lofgreen C, Latendresse S, Petrova A, Plymate S, Raskind M, Grimwood K, Veith RC. 1999. Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Arch Gen Psychiatry.*;56(12):1135-40
28. Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, Gaskin FS, Nonaka N, Jaeger LB, Banks WA, Morley JE, Pinto S, Sherwin RS, Xu L, Yamada KA, Sleeman MW, Tschöp MH, Horvath TL. 2006. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci.* 9 (3): 381-8
29. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. 2011. Insulin effect in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract.* 93 Suppl 1: S52-59
30. Doty RL. 2012. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis.* 46 (3) :527-52
31. Dou JT, Chen M, Dufour F, Alkon DL, Zhao WQ. 2005. Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. *Learn Mem.*12 (6): 646-55
32. Elissondo N, Gómez-Rosso L, Maidana P, Brites F. 2008. Adiponectina: una adipocitoquina con múltiples funciones protectoras. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 42 (1): 17-33
33. Escrivá-Pons F. Ed. 2010. Acciones de la insulina sobre el Sistema Nervioso Central (SNC). Instituto de España y Real Academia de Farmacia. Madrid. Monografía XXIX
34. Fadool DA, Tucker K, Pedarzani P. 2011. Mitral cells of the olfactory bulb perform metabolic sensing and are disrupted by obesity at the level of the Kv1.3 ion channel. *PLoS One.* 6 (9): e24921
35. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S. 2003. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (7): 4162-7
36. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa

- adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (4): 2005-10
37. Gaines AD. 2010. Anosmia and hyposmia. *Allergy Asthma Proc.* 31 (3): 185-9
 38. Ghasemi R, Haeri A, Dargahi L, Mohamed Z, Ahmadiani A. 2013. Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Mol Neurobiol.* 47 (1): 145-71
 39. Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM. 2000. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1823–1828
 40. Girard, J. 2006. The inhibitory effects of Insulin on hepatic glucose production are both direct and indirect. *Diabetes*, vol. 55, supplement 2. S65-S69
 41. Goldstein BJ, Scalia R. 2007. Adipokines and vascular disease in diabetes. *Curr Diab Rep.* 7 (1): 25-33
 42. Gupta G, Azam M, Baquer NZ. 1992. Modulation of rat brain insulin receptor kinase activity in diabetes. *Neurochem Int.* 20 (4): 487-92
 43. Guthoff M, Tschritter O, Berg D, Liepelt I, Schulte C, Machicao F, Breer H, Haering HU, Fritsche A. 2011. A polymorphism in the gene encoding AdipoR1 affects olfactory recognition. *Int J Obes (Lond).* 35 (6): 873-6
 44. Han W, Li C. 2010. Linking type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* ;107 (15): 6557-8
 45. Harvey J, Ashford ML. 2003. Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology.* 44 (7): 845-54
 46. Hass N, Haub H, Stevens R, Breer H, Schwarzenbacher K. 2011. Expression of adiponectin receptor 1 in olfactory mucosa of mice. *Cell Tissue Res.* 334 (2): 187-197
 47. Henneberg N, Hoyer S. 1994. Short-term or long-term intracerebroventricular (i.c.v.) infusion of insulin exhibits a discrete anabolic effect on cerebral energy metabolism in the rat. *Neurosci Lett.* 175 (1–2): 153–156
 48. Hill JM, Lesniak MA, Pert CB, Roth J. 1986. Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience.* 17: 1127–1136

49. Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, Davis KE, Bikman BT, Halberg N, Rutkowski JM, Wade MR, Tenorio VM, Kuo MS, Brozinick JT, Zhang BB, Birnbaum MJ, Summers SA, Scherer PE. 2011. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med.* 17 (1): 55-63
50. Hoyda TD, Ferguson AV. 2010. Adiponectin modulates excitability of rat paraventricular nucleus neurons by differential modulation of potassium currents. *Endocrinology.* 151 (7): 3154-62
51. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 271 (18): 10697-70
52. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. 2004. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (28): 10308-13
53. Jeon BT, Shin HJ, Kim JB, Kim YK, Lee DH, Kim KH, Kim HJ, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Roh GS. 2009. Adiponectin protects hippocampal neurons against kainic acid-induced excitotoxicity. *Brain Res Rev.* 61 (2) 81-88
54. Jones A, Kulozik P, Ostertag A, Herzig S. 2009. Common pathological processes and transcriptional pathways in Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Alzheimers Dis.* 16 (4): 787-808
55. Jung TW, Lee JY, Shim WS, Kang ES, Kim JS, Ahn CW, Lee HC, Cha BS. 2006. Adiponectin protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP+-induced cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 343 (2): 564-570
56. Kadowaki T, Yamauchi T. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 26 (3): 439-51
57. Kaidanovich-Beilin O, Cha DS, McIntyre RS. 2012. Crosstalk between metabolic and neuropsychiatric disorders. *F1000 Biol Rep;* 4:14
58. Kay LM, Sherman S. 2007. An argument for an olfactory thalamus. *Trends Neurosci.* 30; 47–53
59. Khemka VK, Bagchi D, Bandyopadhyay K, Bir A, Chattopadhyay M, Biswas A, Basu D, Chakrabarti S. 2014. Altered serum levels of adipokines and insulin in probable Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 41 (2): 525-33
60. Kim B, Feldman EL. 2012. Insulin resistance in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab.* 23:133-141

61. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE. 2007. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*. 117 (9): 2621–37
62. Kjelvik G, Saltvedt I, White LR, Stenumgård P, Sletvold O, Engedal K, Skåtun K, Lyngvær AK, Steffenach HA, Håberg AK. 2014. The brain structural and cognitive basis of odor identification deficits in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *BMC Neurol*. 14: 168
63. Koekkoek L L., Mul J.D., la Fleur S.E. Glucose-Sensing in the Reward System. *Front Neurosci*. 2017 Dec 19;11:716.
64. Kola B. 2008. Role of AMP-activated protein kinase in the control of appetite. *J Neuroendocrinol*. 20 (7): 942-51
65. Kos K, Harte AL, da Silva NF, Tonchev A, Chaldakov G, James S, Snead DR, Hoggart B, O'Hare JP, McTernan PG, Kumar S. 2007. Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab*. 92 (3): 1129-36
66. Krishna M, Narang H. 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell. Mol. Life Sci*. 65, 3525–3544
67. Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. 2007. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab*. 6 (1):55-68
68. Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, Maeda K, Nagaretani H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Funahashi T, Matsuzawa Y. 2004. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation*. 109 (17): 2046-9
69. Ledri M, Sørensen AT, Madsen MG, Christiansen SH, Ledri LN, Cifra A, Bengzon J, Lindberg E, Pinborg LH, Jespersen B, Gøtzsche CR, Woldbye DP, Andersson M, Kokaia M. 2015. Differential Effect of Neuropeptides on Excitatory Synaptic Transmission in Human Epileptic Hippocampus. *J Neurosci*. 35 (26): 9622-31
70. Lee EB, Warmann G, Dhir R, Ahima RS. 2011. Metabolic dysfunction associated with adiponectin deficiency enhances kainic acid-induced seizure severity. *J Neurosci*. 31 (40): 14361-14366

71. Leuner B, Gould E, Shors TJ. 2006. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*. 16: 216–224
72. Loch D, Heidel C, Breer H, Strotmann J. 2013. Adiponectin Enhances the Responsiveness of the Olfactory System. *PLoS ONE*. 8 (10): e75716
73. Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1996. Chain migration of neuronal pre- cursors. *Science* 271; 978–981
74. Lowell BB, Shulman GI. 2005. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. 307 (5708): 384-7
75. Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. 2004. Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology*. 12; 63(7):1187-92
76. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*. 221 (2): 286-9
77. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 8 (7): 731-7
78. Marks JL, Porte D Jr, Stahl WL, Baskin DG. 1990. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*. 127 (6): 3234-6
79. Matsumoto H, Rhoads DE. 1990. Specific binding of insulin to membranes from dendrodendritic synaptosomes of rat olfactory bulb. *J Neurochem*. 54(1):347-50
80. Mendieta-Zerón H, López M., Diéguez C. 2007. Regulación hipotalámica de la ingesta por nutrientes y estado metabólico. *Rev Esp Obes*; 5 (6): 351-362
81. Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao S.K, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R. 1996. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87; 675–686
82. Moreira P, Santos MS, Seíça R, Oliveira CR. 2007. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes *Journal of the Neurological Sciences*. 257, 206–214
83. Moreira PI, Cardoso SM, Pereira CM, Santos MS, Oliveira CR. 2009. Mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease and diabetes. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 8 (6): 492-511

84. Mounier C, Posner BI. 2006. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol.* 84 (7): 713-24
85. Mulligan C, Moreau K, Brandolini M, Livingstone B, Beaufrère B, Boirie Y. 2002. Alterations of sensory perceptions in healthy elderly subjects during fasting and refeeding. A pilot study. *Gerontology.* 48 (1): 39–43
86. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. 1996. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem.* 120 (4): 803-12
87. Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, Pang Z, Chen AS, Ruderman NB, Chen H, Rossetti L, Scherer PE. 2006. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem.* 281 (5): 2654-60
88. Neumann K, Rojo L, Navarrete LP, Farías G, Reyes P, Maccioni RB. 2008. Insulin resistance and Alzheimer’s disease: molecular links & clinical implications. *Current Alzheimer Research Curr Alzheimer Res.* 5(5): 438-47
89. Neumeier M, Weigert J, Buettner R, Wanninger J, Schäffler A, Müller AM, Killian S, Sauerbruch S, Schlachetzki F, Steinbrecher A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C. 2007. Detection of adiponectin in cerebrospinal fluid in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293 (4): E965-9
90. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). *Diario Oficial de la Federación, México, 6 de diciembre de 1999*
91. O’Doherty J, Rolls ET, Francis S, Bowtell R, McGlone F, Kobal G, Renner B, Ahne G. 2000. Sensory-specific satiety-related olfactory activation of the human orbitofrontal cortex. *Neuroreport.* 11 (4): 893–897
92. Oliart R., Angulo O., Torres-Marquez M.E. 1998. Insulina: Su gen y su mecanismo de acción molecular. *Boletín De Educación Bioquímica, vol 17 No. 2 p 79-85*
93. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. 1999. Novel modulator for endothelial adhesion molecules – Adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation, 100; 2473–2476*
94. Pager J, Giachetti I, Holley A, Le Magnen J. 1972. A selective control of olfactory bulb electrical activity in relation to food deprivation and satiety in rats. *Physiol Behav.* 9 (4): 573-9

95. Palomer X, Pérez A, Blanco-Vaca F. 2005. Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Med Clin (Barc)*. 124 (10): 388-95
96. Palouzier-Paulignan B, Lacroix MC, Aimé P, Baly C, Caillol M, Congar P, Julliard AK, Tucker K, Fadool DA. 2012. Olfaction under metabolic influences. *Chem Senses*. 37 (9); 769-797
97. Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC. 2000. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiology & Behavior* 68, 509–514
98. Park CR. 2001. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 25; 311-323
99. Parker-Duffen JL, Nakamura K, Silver M, Kikuchi R, Tigges U, Yoshida S, Denzel MS, Ranscht B, Walsh K. 2013. T-cadherin is essential for adiponectin-mediated revascularization. *J Biol Chem*. 288 (34): 24886-97
100. Paxinos and C. Watson. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th edition. Academic Press, San Diego, California.
101. Plum L, Schubert M, Brüning JC. 2005. The role of insulin receptor signalling in the brain. *Trends Endocrinol Metab*. 16: 59-65
102. Porcile C, Di Zazzo E, Monaco ML, D'Angelo G, Passarella D, Russo C, Di Costanzo A, Pattarozzi A, Gatti M, Bajetto A, Zona G, Barbieri F, Oriani G, Moncharmont B, Florio T, Daniele A. 2014. Adiponectin as novel regulator of cell proliferation in human glioblastoma. *J Cell Physiol*. 229 (10): 1444-54
103. Psilopanagioti A, Papadaki H, Kranioti EF, Alexandrides TK, Varakis JN. 2009. Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. *Neuroendocrinology*. 89 (1): 38-47
104. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS. 2004. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med*. 10 (5): 524-529
105. Qiu G, Wan R, Hu J, Mattson MP, Spangler E, Liu S, Yau SY, Lee TM, Gleichmann M, Ingram DK, So KF, Zou S. 2011. Adiponectin protects rat hippocampal neurons against excitotoxicity. *Age (Dordr)*, 33(2) 155-165
106. Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. 1998. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem*. 273; 32730-32738

107. Reger MA, Watson GS, Frey WH 2nd, Baker LD, Cholerton B, Keeling ML, Belongia DA, Fishel MA, Plymate SR, Schellenberg GD, Cherrier MM, Craft S. 2006. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiol Aging*. 27 (3) :451-8
108. Reznikov KY. 1991. *Cell Proliferation and Cytogenesis in the Mouse Hippocampus*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
109. Risold PY, Swanson LW. 1996. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science*. 272: 1484–1486
110. Rochefort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM. 2002. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J. Neurosci*. 22; 2679–2689
111. Rodgers EE, Theibert AB. 2002. Functions of PI3-kinase in development of the nervous system. *Int. J. Dev. Neurosci*. 20(3-5): 187-197
112. Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, Castaño JP, Malagon MM. 2007. Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology*. 148 (1): 401-10
113. Rousselot P, Lois C, Alvarez-Buylla A. 1995. Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J. Comp. Neurol*. 351; 51–61
114. Schäfer M, Erdö SL. 1991. Development of glutamate neurotoxicity in cortical cultures: induction of vulnerability by insulin. *Brain Res Dev Brain Res*. 62 (2): 293-6
115. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 270 (45): 26746-9
116. Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, Kondo T, Alber J, Galdiks N, Küstermann E, Arndt S, Jacobs AH, Krone W, Kahn CR, Brüning JC. 2004. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101(9): 3100–3105
117. Schultz C, Engelhardt M. 2014. Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci*. 34: 6-17
118. Shepherd GM, Chen WR, Greer CA. 2004. Olfactory bulb. In: Shepherd, G.M. (Ed.). *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press, New York, pp. 165–216

119. Siddle K. 2011. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *Journal of Molecular Endocrinology*. 47; R1-R10
120. Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, Youngren JF, Havel PJ, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. 2002. Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes*. 51 (6): 1884-8
121. Stryer L. 2007. *Bioquímica*. 6a edición. Edit Reverté
122. Takeuchi S, Wada K, Nawashiro H, Uozumi Y, Otani N, Nagatani K, Kobayashi H, Shima K. 2013. Decrease in plasma adiponectin level and increase in adiponectin immunoreactivity in cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Turk Neurosurg*. 23 (3): 349-54
123. Teixeira AL, Diniz BS, Campos AC, Miranda AS, Rocha NP, Talib LL, Gattaz WF, Forlenza OV. 2012. Decreased levels of circulating adiponectin in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*. 15 (1): 115-21
124. Thundyil J, Pavlovski D, Sobey CG, Arumugam TV. 2012. Adiponectin receptor signalling in the brain. *Br J Pharmacol*. 165 (2): 313-27
125. Thundyil J, Tang SC, Okun E, Shah K, Karamyan VT, Li YI, Woodruff TM, Taylor SM, Jo DG, Mattson MP, Arumugam TV. 2010. Evidence that adiponectin receptor 1 activation exacerbates ischemic neuronal death. *Exp Transl Stroke Med*. 2 (1): 15
126. Tishinsky JM, Robinson LE, Dyck DJ. 2012. Insulin-sensitizing properties of adiponectin. *Biochimie*. 94 (10): 2131-6
127. Tomlinson DR, Gardiner NJ. 2008. Glucose neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*; 9(1):36-45
128. Traub RD, Miles R. 1991. *Neural Networks of the Hippocampus*. Cambridge, UK: Cambridge University Press
129. Trellakis S, Tagay S, Fischer C, Rydleuskaya A, Scherag A, Bruderek K, Schlegl S, Greve J, Canbay AE, Lang S, Brandau S. 2011. Ghrelin, leptin and adiponectin as possible predictors of the hedonic value of odors. *Regul Pept*. 167 (1): 112-7
130. Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM. 1998. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett*. 438 (1-2): 71-5

131. Une K, Takei YA, Tomita N, Asamura T, Ohru T, Furukawa K, Arai H. 2009. Adiponectin in plasma and cerebrospinal fluid in MCI and Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 18; 1006–1009
132. Urbán N, Guillemot F. 2014. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci.* 8: 396
133. Van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP. 2006. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Progress in Neurobiol.* 79(4): 205-221
134. Vannucci SJ, Koehler-Stec EM, Li K, Reynolds TH, Clark R, Simpson IA. 1998. GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res.;* 797(1): 1-11
135. Vannucci SJ, Seaman LB, Brucklacher RM, Vannucci RC. 1994. Glucose transport in developing rat brain: glucose transporter proteins, rate constants and cerebral glucose utilization. *Mol Cell Biochem.* 140 (2): 177-84
136. Varas M, Pérez M, Monzón ME, de Barioglio SR. 2002. Melanin-concentrating hormone, hippocampal nitric oxide levels and memory retention. *Peptides.* 23 (12): 2213-21
137. Voet, D. 2006. *Bioquímica.* 3ra edición. Edit Panamericana
138. Wan Z, Mah D, Simtchouk S, Klegeris A, Little JP. 2014. Globular adiponectin induces a pro-inflammatory response in human astrocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 446 (1): 37-42
139. Wan Z, Mah D, Simtchouk S, Klegeris A, Little JP. 2014. Globular adiponectin induces a pro-inflammatory response in human astrocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 446 (1): 37-42
140. Wang J, Shen L, Najafi H, Kolberg J, Matschinsky FM, Urdea M, German M. 1997. Regulation of insulin preRNA splicing by glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (9): 4360-5
141. Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, McKinley MJ, Figdor R, Allen AM, Mendelsohn FA. 1987. Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology.* 121 (4): 1562-70
142. White M.F. 1998. The IRS-signalling system: A network of docking proteins that mediate insulin action. *Molecular and Cellular Biochemistry,* 182: 3–11

143. Witter MP. 2001. Hippocampus and Related Structures. En N.J. Smelser y P.B. Baltus (eds.) International encyclopedia of the social and behavioral sciences. Oxford, Pergamon Press. Pp. 6711-6718
144. Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. 2013. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. Clin Chim Acta. 417: 80-4
145. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature. 423 (6941): 762-9
146. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y. 2000. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. Blood. 2000. 96 (5): 1723-32
147. Youngren J. 2007. Regulation of insulin receptor function. Cell. Mol. Life Sci. 64; 873-891
148. Zhang D, Guo M, Zhang W, Lu XY. 2011. Adiponectin stimulates proliferation of adult hippocampal neural stem/progenitor cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)/glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β)/ β -catenin signaling cascade. J Biol Chem. 286 (52): 44913-20.
149. Zhao WQ, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. 2004. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. Eur J Pharmacol. 490(1-3): 71-81
150. Zhao WQ, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, Alkon DL. 1999. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. J. Biol. Chem. 274, 34893-34902
151. Zhu X, Perry G, Smith MA. 2005. Insulin signaling, diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease. Journal of Alzheimer's Disease 7 (2005) 81-84 81
152. Zoico E, Di Francesco V, Mazzali G, Vettor R, Fantin F, Bissoli L, Guariento S, Bosello O, Zamboni M. 2004. Adipocytokines, fat distribution, and insulin resistance in elderly men and women. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 59 (9): M935-9

Research Article

Distribution of Adiponectin Receptors 1 and 2 in the Rat Olfactory Bulb and the Effect of Adiponectin Injection on Insulin Receptor Expression

Alfredo Miranda-Martínez,^{1,2} Octavio Fabián Mercado-Gómez,¹ Virginia Arriaga-Ávila,¹ and Rosalinda Guevara-Guzmán¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Del. Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico

²Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas, Edificio B, 1° Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Rosalinda Guevara-Guzmán; rguevara@unam.mx

Received 10 August 2017; Revised 8 November 2017; Accepted 14 November 2017; Published 31 December 2017

Academic Editor: Franco Veglio

Copyright © 2017 Alfredo Miranda-Martínez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Adiponectin (APN) is an adipocyte-derived hormone that has peripheral beneficial effects. Although its receptors AdipoR1 and AdipoR2 are expressed in the brain, their function in neurons is poorly understood. The aims of this work were to describe the distribution of APN receptors in the olfactory bulb (OB) as well as the possible effects of APN injection on the insulin receptor (InsR) content and Akt kinase. **Method.** We performed the double immunofluorescence technique to describe the distribution of AdipoRs and the cellular type they were expressing. mRNA transcript and protein content were assessed by RT-PCR and Western blot, respectively. APN injection was performed to analyze its possible effect on the insulin pathway. **Results.** We found that AdipoRs were localized in all cell layers and in both neurons and astrocytes. We observed the presence of mRNA transcripts and immunoblot analysis confirmed the protein on the intact OB; APN injection in the OB resulted in a slight decrease of the total InsR and Akt phosphorylation and a reduction of phopho-InsR content. **Conclusions.** These data demonstrated that AdipoRs are expressed in OB regions, and APN injection could act as an insulin pathway modulator in the OB and thus possibly contribute to olfaction physiology.

1. Introduction

Research efforts have demonstrated that the central nervous system (CNS) is tightly linked with the endocrine system to regulate the food intake and energy balance. Thus, a variety of hormones are released by the gastrointestinal tract, associated glands, or peripheral tissues which are carried by the bloodstream to exert their functions in distant targets [1].

Adiponectin (APN) is a hormone mainly secreted from adipocytes [2] that has been involved in several physiological functions. Specifically, APN is associated with improving insulin sensitivity, glucose uptake, and lipid metabolism [3–5]; as modulator of the endothelial function or exerting antiatherogenic, anti-inflammatory, and cardioprotective effects [6, 7].

Interestingly, the low plasma level of APN contributes to the development of metabolic and cardiovascular diseases [8–10] and results in a risk factor for neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease [11–13].

Previous studies indicate that adiponectin receptors 1 and 2 (AdipoR1 and AdipoR2) are widely expressed throughout the central nervous system (CNS), including cortex, hypothalamus, and hippocampus [14]. It is well known that APN acts centrally to control energy metabolism [15] and also as an important neuroprotective hormone [16–19] because of its neurotrophic factor activity which benefits neural function [20].

On the other hand, the olfactory system is essential for the survival of many animal species, providing sensorial

information about food and environment, as well as influencing social and sexual behaviors [21]. A physiological role of APN over the olfactory system, especially olfactory bulbs (OB), has not been investigated in detail. Nevertheless, Hass and colleagues have shown the presence of AdipoR1 transcript in the mouse olfactory mucosa and postulated its possible role in the nutritional status of the body [22]. Furthermore, it was recently demonstrated that APN increases the amplitude of response in olfactory epithelial cells under odor stimulation indicating that APN acts as an orexigenic signal that it can modulate the response of the olfactory neurons independently of which odorant receptors are being expressed [23].

It is well known that the brain is an insulin-sensitive organ and the presence of insulin and its specific receptor in several brain regions has been well described [24]. In this regard, the insulin receptor (InsR) is highly expressed in the hypothalamus, the hippocampus, and the OB, brain-related structures implicated in glucoregulation, feeding regulation, circuit development, food intake, and cognitive processing [24–26]. Interestingly, APN is described to act primarily as an insulin-sensitizing hormone, being the liver and the skeletal muscle its main targets; however, it is not well known to what level APN is exerting its insulin sensitivity effect [14]. In this regard, we hypothesize that APN could be acting as a modulator of InsR activity in different regions of the rat's brain, particularly OB, similarly to occur in peripheral tissues. Therefore, the aims of this study were to describe the punctual presence and distribution of AdipoR1 and AdipoR2 in the OB of Wistar male rats and to investigate the effects of APN administration on InsR content and insulin signaling in this brain region.

2. Materials and Methods

2.1. Animals. This study was conducted in accordance with the guidelines and requirements of the World Medical Association Declaration of Helsinki (1964) and approved by the Ethics Committee of the Medicine School at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), number FISRGG02021 and regulated by the Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999 to minimize animal suffering. Adult male Wistar rats (250–300 g) were used and maintained under a 12 h light-dark cycle with free access to water and standard laboratory chow (PMI Nutrition International Inc., Greenwood, MO). Treatments were always conducted in the morning (10:00 am) to avoid circadian effects, and the results show a comparison between vehicle-injected versus ADP-injected animals.

2.2. Immunofluorescence for AdipoR1 and AdipoR2. Animals ($n=6$, intact animals) were deeply anesthetized under sodium pentobarbital overdose (100 mg/kg i.p.) and then transcardially perfused with 200 ml of phosphate buffered saline (PBS) solution (pH = 7.4, 4°C) followed by 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). The OBs were dissected and dehydrated in alcohol solutions (100 to 70%), xilol solution, and mounted in paraffin wax. Coronal sections of 5 μ m thickness of the OB were obtained using a

microtome (Leica Biosystems, Germany) and mounted on poly-L-lysine-treated glass slides. To reduce autofluorescence of the OB sections, we submerge the slides into a Coplin glass filled with a saturated solution of Sudan black B (0.25%) in 70% isopropyl alcohol for 90 min. Then, slides were rinsed with 70% isopropyl alcohol and distilled water and immediately after, OB sections were rinsed with PBS for 5 min and blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS solution for 90 min. Then, antibodies against both adiponectin receptors AdipoR1 (anti-goat antibody, 1:250, Santa Cruz Biotechnology, sc-46748, USA); AdipoR2 (anti-rabbit antibody 1:200, Santa Cruz Biotechnology, sc-99184, USA); the neuronal marker NeuN (anti-mouse antibody clone A60 1:100, Millipore MAB377, USA) and the astrocyte marker GFAP (anti-mouse antibody 1:100, Biocare, USA) were incubated together in blocking solution at 4°C overnight. Anti-mouse, anti-goat, and anti-rabbit 488 and 594 Alexa Fluor dye coupled secondary antibodies (1:500, Thermo Fisher Scientific, USA) were also incubated together in blocking solution during 1 h in room temperature, and then slides were rinsed three times with PBS (5 min each). Mounting medium with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vectashield H-1200, USA) was used for nuclear counterstain. Negative controls consisted of eliminating the primary antibodies for the procedure. The slides were examined under an epifluorescence microscope using a 20x and 40x objectives and photomicrographs were taken using the microscope imaging software (Leica Biosystems, Germany).

2.3. APN Injections in the OB. Previous reports had described that there was an important response to APN treatment within 72 to 96 h (Qi et al. [27]), and for this reason, APN response was measured at 72 h. We also performed dose-dependent assays starting from 500 ng and 1 and 2 μ g of APN and evaluated InsR protein expression at 72 h postinjection ($n=6$). As there were no changes using different doses of APN (data not shown), we chose 1 μ g of APN for subsequent experiments as a mean parameter for the concentration of adiponectin. Then, two groups of animals ($n=6$, each group) were anesthetized with a mix of ketamine-xylazine solution (1 ml/kg) and placed on a stereotaxic apparatus (KOPF Mod 5000, USA); then, stereotaxic injections were made by using a 10 μ l Hamilton syringe (model 701) coupled in manual microinjector with a velocity of 106 nl per revolution (Sutter Instrument USA). One group of animals received 1 μ l of unilateral injection of isotonic saline solution (SS) as control, and the treated group received an injection of APN (1 μ l at a dose of 1 μ g/ μ l of APN oligomer (\approx 25.5 kDa), R&D Systems, 1065-AP-050, USA), directly into the OB according to the following coordinates, with reference to Bregma: (+7.5 mm anteroposterior, -1.0 mm lateral, and -4.0 mm dorsoventral) [28].

2.4. Protein Extraction and Western Blot Analysis. Western blot analysis of the total InsR content, phospho-InsR, and phospho-Akt was conducted in the OB homogenates. Both vehicle and APN-injected animals were sacrificed after 72 of the injection using a sodium pentobarbital overdose, and rapidly, their OB were dissected and then homogenized in

RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 1% of sodium deoxycolate, 0.1% of sodium dodecyl sulfate, 50 mM Tris, and pH 8) supplemented with proteases (Roche, cat number 11697498001, USA) and phosphatases inhibitors (Roche, cat number 04906845001, USA). Proteins were quantified using a Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, cat number 23235, USA), and 60 μ g was separated by electrophoresis in 10% SDS-PAGE gels. Then, proteins were transferred to PVDF membranes (Merck Millipore, cat number ISEQ00010, USA), blocked with 5% nonfat dry milk diluted in 0.1% Tween-20 Tris-Buffered Saline (TBST) and incubated at 4°C overnight with rabbit polyclonal anti-p-AMPK (Thr 172) (cell signaling, cat number 2535, USA), rabbit polyclonal anti-total AMPK (Abcam, ab3760, USA), mouse monoclonal anti- β -InsR (Millipore, cat number 05-1104, USA), goat polyclonal anti-p-insulin $R\beta$ (Tyr 1162/1163) (Santa Cruz Biotechnology, sc-25103, USA), or rabbit polyclonal anti-p-Akt 1/2/3 (Ser 473) (Santa Cruz Biotechnology, sc-7985-R, USA) antibodies diluted 1:1000. After incubation with the primary antibodies, membranes were incubated with anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005), anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, sc-2768, USA) or anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology, sc-2004, USA) horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies diluted 1:10,000. Moreover, goat polyclonal anti- β -actin antibody (Santa Cruz Biotechnology sc-1616, USA) diluted 1:10,000 was used as loading control.

AdipoR1 and AdipoR2 protein content in the OB of intact rats ($n = 6$) was visualized with goat polyclonal anti-AdipoR1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, sc-46748, USA) and rabbit polyclonal anti-AdipoR2 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, sc-99184, USA) following the same immunoblot protocol. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Sigma-Aldrich G8795, USA) was used instead of anti- β -actin as the loading control.

Immunoreactive bands were detected using chemiluminescence reactive (Millipore cat number WBLUF0500, USA) in higher performance film (Amersham cat number 28-9068-39, USA). The bands were analyzed in Image MCID Analysis Software (Interfocus, Imaging LTD, UK). The relative optical density of each band of different primary antibodies was normalized to its loading control.

2.5. RT-PCR Transcript Analysis. The total RNA was extracted from intact OB tissue ($n = 5$) using Trizol reagent (Invitrogen 15596-018, USA) following the manufacturer's instructions. In addition, gastrocnemius muscle and liver total RNA samples were used as positive controls for AdipoR1 and AdipoR2, respectively. The integrity of the total RNA was achieved by electrophoresis in 1% agarose gel pre-stained by GelRed dye (Biotium 41003, USA) observing the well-defined bands of 18S and 28S rRNA without smearing, and the concentration and purity were estimated spectrophotometrically at 206 and 280 nm ratio.

All RNA samples were treated with a DNA-free kit (Ambion AM1906, USA) to avoid genomic DNA contamination. Two micrograms of total RNA was used to synthesize the first strand of cDNA using the Rever Aid First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific K1622, USA)

following the manufacturer's instructions. The cDNA was amplified by polymerase chain reaction by using Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific K0251, USA), 500 ng of cDNA OB sample, and the following gene-specific primers over 40 cycles in 10 μ l of total volume: AdipoR1, 5'CCACCATGC ACTTTACTATC3', forward and 5'ATGAGACTGGAACC ATATGTC3', reverse; AdipoR2, 5'TGACATCTGGTTTCAC TTTC3', forward and 5'TCATGAAACGAAATTCCTGC3', reverse (KiCqStar primers, Sigma-Aldrich KSPQ12012, USA). Each sample was run in duplicate, and the PCR products were separated in a 2% agarose gels, stained with GelRed dye (Biotium 41003, USA) solution and visualized in a UV transilluminator.

2.6. Statistics. The values of relative optical units were reported in arbitrary units as the mean \pm standard error ($m \pm SE$). All dataset was examined to test the normality and then, two-tailed Student *t*-test was performed to compare control versus APN-treated group. Statistical tests were analyzed using Prism GraphPad statistics software, version 5.01 (GraphPad Software, USA). In all cases, $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. AdipoR1 and AdipoR2 Are Expressed in the OB in Rat Brain. To confirm the presence and distribution of AdipoR1 and AdipoR2 in the distinct layers of the olfactory bulb (Figure 1(a)), we performed immunofluorescence assays. As we can see, AdipoR1 was present in three main cellular groups of the OB such as periglomerular, mitral, and granular cell layers (Figures 1(b)–1(d), resp.); such immunoreactivity was detected in a diffuse and punctate pattern in the cells (arrow). Moreover, we also performed double immunofluorescence to characterize the cellular type that could be expressing the APN receptors. We observed that AdipoR1 is strongly colocalized with a neuronal marker (NeuN) (Figures 1(b) and 1(d)) and with astrocyte marker (GFAP) mainly in some parts of the astrocyte processes and some cases in the whole astrocyte (Figure 1(e), arrowhead). Interestingly, mitral cells do not stain with NeuN marker (Figure 1(c)). On the other hand, strong immunolabeling for AdipoR2 was also observed in the mitral cell layer (Figure 2(b)), whereas the expression was less intense in the periglomerular and granular layers (Figures 2(a) and 2(c)). Furthermore, double immunofluorescence assay showed colocalization with AdipoR2 and NeuN (Figures 2(a) and 2(c)) with the exception of mitral cells where there is no NeuN staining (Figure 2(b)) but strong colocalization within the whole astrocyte cells (Figure 2(d)). Interestingly, these findings were similar to those of Guillod-Maximin and colleagues where they showed that AdipoR1 is colocalized with NeuN marker and less extent with GFAP and AdipoR2 is strongly colocalized with both neuronal and glial markers in hypothalamic neurons [29].

We assessed whether mRNA of both receptors was being expressed in OB tissue. By means of RT-PCR analysis, mRNA transcripts of both APN receptors were detected in the OB tissue and they correspond to those described

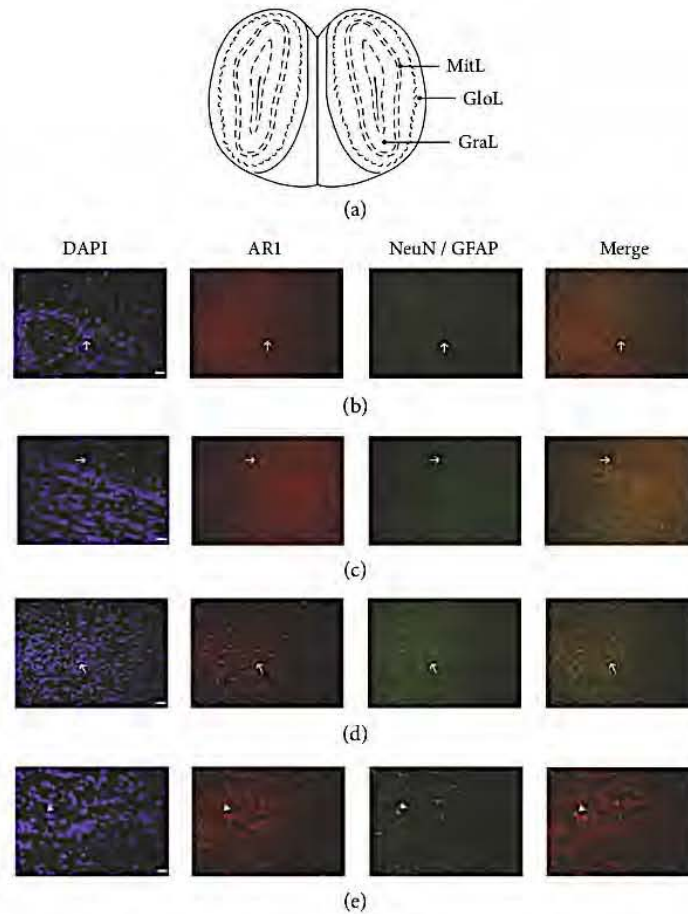


FIGURE 1: Presence and distribution of AdipoR1 in OB tissue from intact rats. Schematic representation of anatomical localization of the main OB layers (scheme modified from [28]) (a). As it is observed, AdipoR1 immunoreactivity is found in periglomerular (b), mitral (c), and granular cell layers (d). Double immunostaining shows that AdipoR1 colocalize with both neuronal marker (b and d, arrow) and astrocyte marker (e, arrowhead). Interestingly, mitral cells do not stain with NeuN marker. Nuclei were counterstained with DAPI to identify the different layers of OB. Scale bar corresponds to $20\ \mu\text{m}$ (40X). GloL: periglomerular cell layer; MitL: mitral cell layer; and GraL: granular cell layer.

in skeletal muscle (AdipoR1) and in the liver (AdipoR2) (Figure 3(a)). We also performed Western blot assays to examine protein content of APN receptors. As we can observe in Figure 3(b), both AdipoR1 and AdipoR2 protein contents are present in OB homogenates from intact rats and interestingly, there was a significant increase of the content of AdipoR1 compared with the AdipoR2 content (Figure 3(c)). These results demonstrated that OB is able to express both mRNA transcripts and the protein of APN receptors as in other brain regions (i.e., hypothalamus or hippocampus).

3.2. Differential Content of Total InsR, InsR, and Akt Phosphorylation after Injection of APN in OB. In another series of experiments, we analyzed the possible effect of the injections of $1\ \mu\text{g}$ of APN in the right OB on the insulin signaling pathway by measuring the total content of InsR and InsR and Akt phosphorylation in contralateral

OB. Figure 4(a) shows the trajectory of the syringe in the OB to ensure the correct injection site (Figure 4(a)). First, we evaluated whether the adiponectin injection can activate its receptors and produce the transduction of the signaling pathway. Seventy-two hours after APN injection in the ipsilateral OB, injected animals showed an increase of AMPK phosphorylated at the residue Thr172 confirming that the APN injection produced a response activating its receptors (Figure 4(b)). Moreover, adiponectin injection produced a slight decrease in total InsR protein and a pronounced decrease in the phosphorylated-InsR compared with that of saline-injected animals; however, it was not statistically significant (Figures 4(b) and 4(c)). Moreover, the phosphorylation Akt kinase, a downstream component of insulin signaling pathway, was slightly reduced in protein content when compared with that of vehicle controls without being statistically significant (Figures 4(b) and 4(c)).

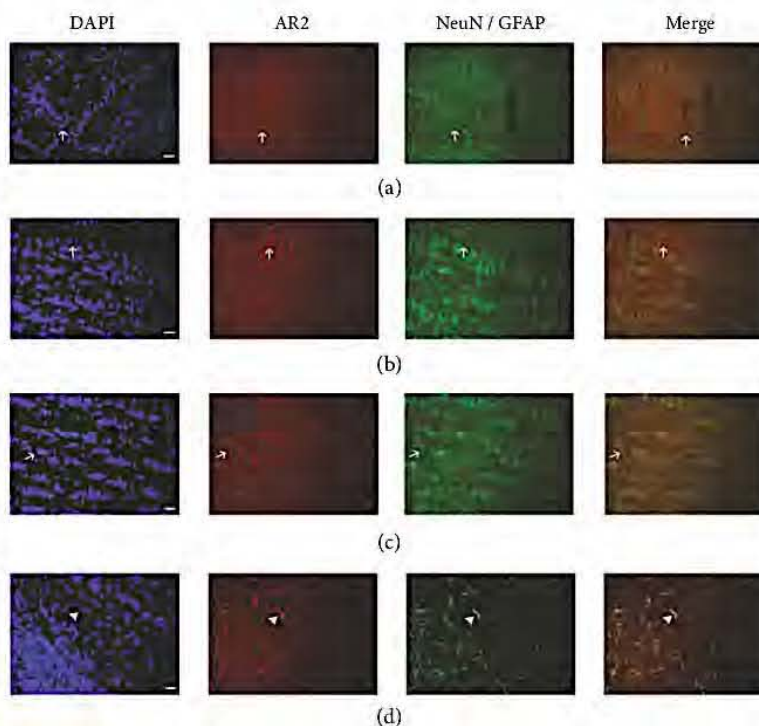


FIGURE 2: Distribution of AdipoR2 in OB tissue from intact rats. AdipoR2 immunoreactivity is also found in periglomerular (a), mitral (b), and granular cell layers (c); however, the mark of the immunoreactivity is less intense compared with AdipoR1 (Figure 1). Double immunostaining shows that AdipoR2 colocalize with both neuronal markers (a, b, and c, arrow) and had a strong mark with astrocyte marker (d, arrowhead). Note that mitral cells do not stain with NeuN marker. Nuclei were counterstained with DAPI to identify the different layers of OB. Scale bar corresponds to 20 μm (40x).

4. Discussion

Recent reports have described that peripheral adipokines and gut hormones may alter the perception and pleasantness of specific odors, presumably directly through their receptors in the olfactory system or indirectly through central interfaces between the regulation systems of olfaction, appetite control, memory, and motivation [30]. Moreover, a decreased in the sense of smell can lead to a significant impairment of quality of life, including taste disturbance and loss of pleasure from eating, which results in changes in weight and difficulty avoiding health risks, such as spoiled food [31].

As described in scientific literature, there is robust information about mechanisms where adiponectin (APN) is involved in metabolic regulation in peripheral tissues [32] and it has been proposed as a plasma marker of metabolic syndrome or type 2 diabetes mellitus [33]. APN exerts its function throughout the interaction with its receptors 1 and 2 (AdipoR1 and AdipoR2) which are widely expressed throughout CNS, including cortex, hypothalamus, and hippocampus [14]. Nevertheless, there were no reports describing that both gene and protein expression of AdipoR1 and AdipoR2 were present in the olfactory bulb of the rat brain even though the effect of APN in the responsiveness in olfactory system had been previously described [23]. In this

regard, our results from immunoblot and immunofluorescence assays demonstrated the presence and a differential expression of AdipoR1 and AdipoR2 in different OB cell layers. The fact that we observed the differential expression of AdipoR1 and AdipoR2 in the periglomerular, mitral, and granular cell layers could be related with the roles that these three types of cells play in the olfactory system, that is, mitral cell process information from the olfactory epithelium while granular cells are modulators of this activity [34]. However, AdipoR1 expression was predominant in the OB when compared with AdipoR2, suggesting that APN signaling in the OB could be mainly mediated by AdipoR1 activation. Another puzzle is whether APN receptors have differential function according to their cellular type. As we have demonstrated, astrocytes and neuronal cells express both AdipoR1 and AdipoR2 receptors in OBs which agree with previous results where APN receptors are expressed in astrocyte and neuronal cell cultures [35] or in neurons and astrocytes in the arcuate and paraventricular hypothalamic nuclei [29]; however, very little is known about a specific function receptor for each cell type.

The presence of AdipoR1 in the olfactory epithelium of mice was attributed to a potential modulatory role of APN in the olfactory system [22]. Pretreatment with APN resulted in a higher response to an odorant stimulus in association with an increase in the neuronal activity of the periglomerular cells [23]. Furthermore, Guthoff and colleagues found a

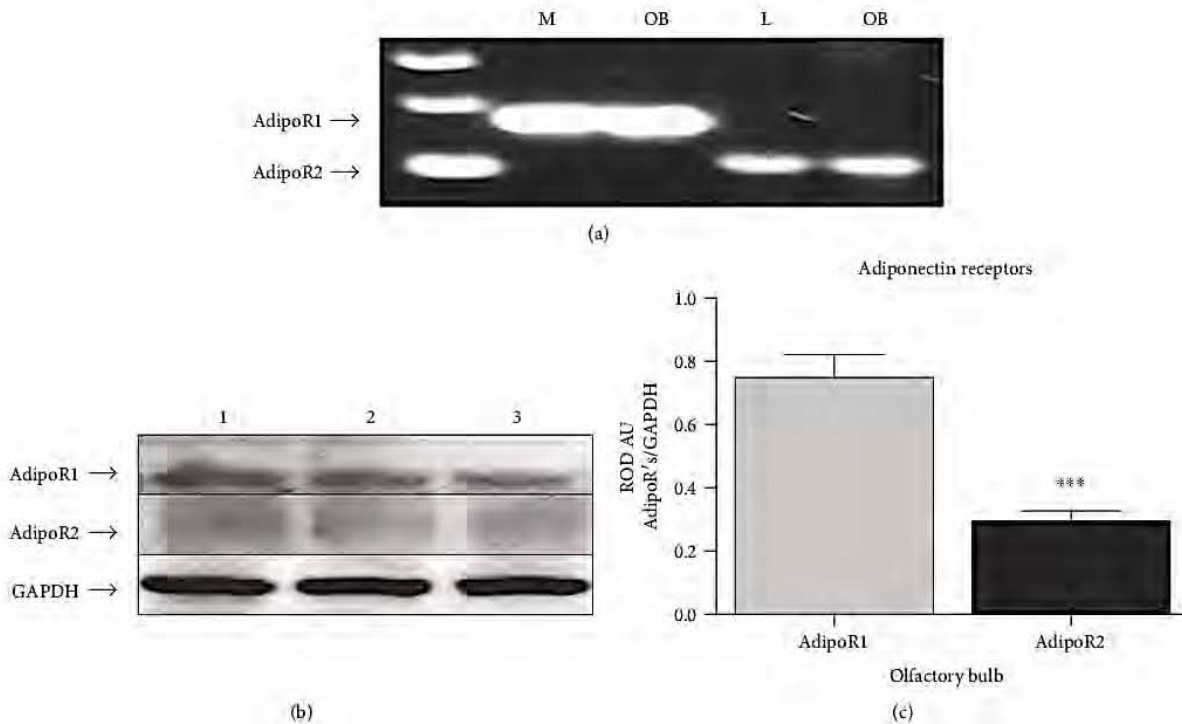


FIGURE 3: mRNA transcripts and protein content of both AdipoR1 and AdipoR2 in OB samples. RT-PCR analysis shows the presence of the mRNA transcripts corresponding to AdipoR1 (170 bp) and AdipoR2 (104 bp) in OB tissue. Skeletal muscle and liver were used as positive controls for AdipoR1 and AdipoR2, respectively (a). Furthermore, Western blot analysis shows protein content of adiponectin receptors in OB homogenates from intact rats (b), being AdipoR1 the receptor with major protein content compared with AdipoR2 (c). $n = 6$, *** $p < 0.001$.

genetic variation in the promoter region of AdipoR1 that it is associated with decreased olfactory recognition in healthy human subjects [36]. As soon as the animals detect a food odor, an increase in the electrical activity of the mitral cells is observed [37]. According to these findings, we could hypothesize that whether an animal is in starving state, APN levels will increase in the periphery and it would cross to the blood-brain barrier and would bind to its receptors in different cells of the olfactory system (i.e., olfactory epithelium, and OBs) modulating the responsiveness to odors [23] and transmit the response to central brain structures, such as the hypothalamus to regulate food intake [29]. Recently, it has been observed that APN levels are increased in serum and cerebral spinal fluid (CSF) and the expression of the APN, and its receptor (AdipoR1 and AdipoR2) genes are upregulated in the liver and visceral adipose tissues in fasting condition [15, 38]. Nevertheless, experimental work is needed to prove such hypothesis.

On the other hand, glucose brain metabolism and olfactory function seem to be closely related; thus, the presence of InsR and AdipoRs throughout the brain suggests an interaction between APN and insulin activities in the central nervous system (CNS), particularly in the OB [39]. Unlike energetic and anabolic activities that insulin regulates in peripheral tissues, the putative roles of insulin in the CNS are related with feeding behavior regulation and energy expense, neurodevelopment, neuronal survival, learning, and memory

and synaptic plasticity [26]. Even though the injection into the OB of recombinant APN protein had the physiological response when bound to its receptors (by increasing AMP phosphorylation), our results unexpectedly indicated that APN injection to the OB had little effect on due to the fact that there was slight decrease in the total InsR protein content, a pronounced reduction the phosphorylation of the InsR in the OB, and slight decrease of phosphorylation in the insulin downstream effector Akt using $1 \mu\text{g}$ of APN. It is known that APN exists in several forms such as globular, trimers, hexamers, and high molecular weight and the binding of these forms to its receptors can lead to the stimulation of several proteins such as AMPK, p38-MAPK, JNK, and PPAR α [14]. In the present work, we injected commercial APN protein (presumably monomers). However, we cannot assume or discard the formation of trimers, hexamer, or HMW oligomers [15] to explain, in part, the poor response of the APN injection in the content of insR or its phosphorylation. Nevertheless, we believe that adiponectin injection does not have a role in the production or activation of insulin signaling pathway at least in olfactory bulb region. Conversely, APN injection into hippocampus increases the total content of InsR, the phosphorylation of the InsR, and the phosphorylation of Akt (data not shown). According to these findings, we hypothesize that APN could influence the InsR expression and downstream signaling in a tissue-specific manner in the brain depending on the dose

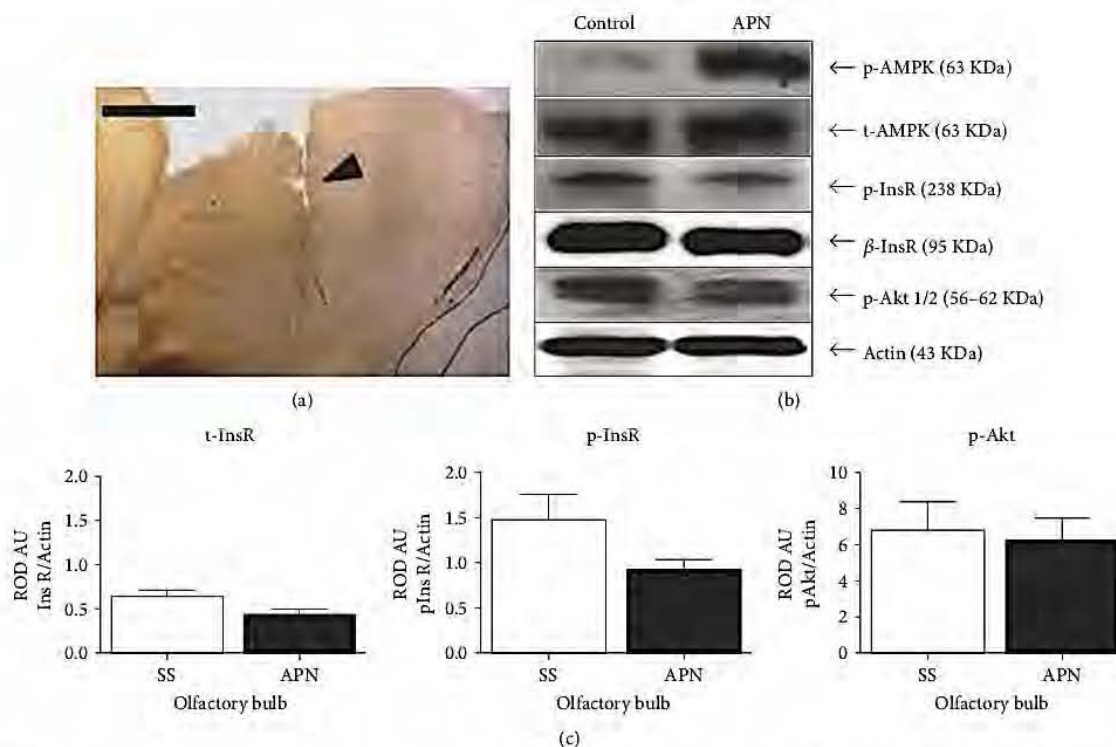


FIGURE 4: Effect of APN injection in OB on InsR protein content and insulin signaling components in OB homogenates. Photomicrograph shows the trajectory of the injection into OB (a). Representative images of immunoblotting show an increased in AMPK phosphorylated at Thr172 residue, a slight decrease of InsR content, a pronounced decrease of InsR phosphorylation, and slight reduction of phosphorylated Akt in OB homogenates 72 h after APN injection (b), respectively; however, none of the analyzed proteins had significant changes (c). Scale bar = 500 μ m.

or the time after APN injection. In this regard, it has been shown that insulin is a strong modulator in the OB and an increase in insulin levels due to food intake could modulate its activity [40]. Thus, the link between the olfactory system and energy balance should not be unexpected given that the perception of odorants drives to food intake and selection [30]. Moreover, APN functions as an insulin sensitizer and the adaptor protein of AdipoRs, the phospho-tyrosine interacting with PH domain and a leucine zipper 1 (APPL1) mediates the activation of insulin signaling which could have an important role in the crosstalk between adiponectin/insulin signaling pathways in target tissues [14, 41].

5. Conclusions

In summary, we demonstrated that AdipoR1 and AdipoR2 are expressed in the main cell layers of the OB having differential distribution. Also, the dose of APN used in the stereotaxic injection activates its receptors but it does not seem to play an important role in the regulation of InsR expression, InsR phosphorylation, and Akt phosphorylation in the OB. Nevertheless, we hypothesize that APN could modulate the insulin pathway in other brain regions, suggesting that it is able to regulate a variety of cellular processes, including olfactory functions at different levels. A better understanding

of how APN is linked to insulin signaling in the CNS is necessary because it is important to know whether this relationship could serve as a possible marker of brain activities and reveal potential therapeutic targets.

Ethical Approval

All procedures performed in this study involving animals were in accordance with ethical standards of the institution.

Conflicts of Interest

The authors declare that this research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Selva Rivas-Arancibia for her commentaries on this manuscript; Dr. Erika Rodríguez-Martínez, MSc Jorge Landgrave-Gómez, and MSc Juan Jair Santillán-Cigales for their technical assistance. This paper has value to the first author as a requirement for obtaining a PhD degree in the Posgrado in Ciencias Biológicas of Universidad Nacional Autónoma de México. The authors thank Mrs. Josefina Bolado, Head of the Scientific Paper Translation

Department, from División de Investigación at Facultad de Medicina, UNAM for editing the English-language version of this manuscript. This work was partially supported by Grants SDELPTID.05.5, CONACyT 24784-M, CONACyT 118673, CONACyT 48630, CONACyT 152613, PAPIIT IN216907, PAPIIT IN200110-3, and PAPIIT IN211913-3. Alfredo Miranda-Martínez received scholarship support from CONACyT 385286.

References

- [1] B. Palouzier-Paulignan, M. C. Lacroix, P. Aimé et al., "Olfaction under metabolic influences," *Chemical Senses*, vol. 37, no. 9, pp. 769–797, 2012.
- [2] J. Fruebis, T. S. Tsao, S. Javarschi et al., "Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 4, pp. 2005–2010, 2001.
- [3] K. Hotta, T. Funahashi, N. L. Bodkin et al., "Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys," *Diabetes*, vol. 50, no. 5, pp. 1126–1133, 2001.
- [4] T. Yamauchi, J. Kamon, H. Waki et al., "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity," *Nature Medicine*, vol. 7, no. 8, pp. 941–946, 2001.
- [5] T. Kadowaki, T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, and K. Tobe, "Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 7, pp. 1784–1792, 2006.
- [6] Y. Okamoto, S. Kihara, N. Ouchi et al., "Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice," *Circulation*, vol. 106, no. 22, pp. 2767–2770, 2002.
- [7] M. T. Villarreal-Molina and B. Antuna-Puente, "Adiponectin: anti-inflammatory and cardioprotective effects," *Biochimie*, vol. 94, no. 10, pp. 2143–2149, 2012.
- [8] M. Kumada, S. Kihara, S. Sumitsuji et al., "Association of hypo adiponectinemia with coronary artery disease in men," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 23, no. 1, pp. 85–89, 2003.
- [9] M. Ryo, T. Nakamura, S. Kihara et al., "Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome," *Circulation Journal*, vol. 68, no. 11, pp. 975–981, 2004.
- [10] S. Lee and H. B. Kwak, "Role of adiponectin in metabolic and cardiovascular disease," *Journal of Exercise Rehabilitation*, vol. 10, no. 2, pp. 54–59, 2014.
- [11] K. Une, Y. A. Takei, N. Tomita et al., "Adiponectin in plasma and cerebrospinal fluid in MCI and Alzheimer's disease," *European Journal of Neurology*, vol. 18, no. 7, pp. 1006–1009, 2011.
- [12] A. L. Teixeira, B. S. Diniz, A. C. Campos et al., "Decreased levels of circulating adiponectin in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease," *Neuromolecular Medicine*, vol. 15, no. 1, pp. 115–121, 2013.
- [13] V. K. Khemka, D. Bagchi, K. Bandyopadhyay et al., "Altered serum levels of adipokines and insulin in probable Alzheimer's disease," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 41, no. 2, pp. 525–533, 2014.
- [14] J. Thundiyil, D. Pavlovski, C. G. Sobey, and T. V. Arumugam, "Adiponectin receptor signalling in the brain," *British Journal of Pharmacology*, vol. 165, no. 2, pp. 313–327, 2012.
- [15] N. Kubota, W. Yano, T. Kubota et al., "Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake," *Cell Metabolism*, vol. 6, no. 1, pp. 55–68, 2007.
- [16] B. T. Jeon, H. J. Shin, J. B. Kim et al., "Adiponectin protects hippocampal neurons against kainic acid-induced excitotoxicity," *Brain Research Reviews*, vol. 61, no. 2, pp. 81–88, 2009.
- [17] B. Chen, W. Q. Liao, N. Xu et al., "Adiponectin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory action," *Brain Research*, vol. 1273, pp. 129–137, 2009.
- [18] G. Qiu, R. Wan, J. Hu et al., "Adiponectin protects rat hippocampal neurons against excitotoxicity," *Age*, vol. 33, no. 2, pp. 155–165, 2011.
- [19] K. H. Chan, K. S. Lam, O. Y. Cheng et al., "Adiponectin is protective against oxidative stress induced cytotoxicity in amyloid-beta neurotoxicity," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, article e52354, 2012.
- [20] D. Zhang, M. Guo, W. Zhang, and X. Y. Lu, "Adiponectin stimulates proliferation of adult hippocampal neural stem/progenitor cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)/glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β)/ β -catenin signaling cascade," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 52, pp. 44913–44920, 2011.
- [21] S. Malvaut and A. Saghatelian, "The role of adult-born neurons in the constantly changing olfactory bulb network," *Neural Plasticity*, vol. 2016, Article ID 1614329, 8 pages, 2016.
- [22] N. Hass, H. Haub, R. Stevens, H. Breer, and K. Schwarzenbacher, "Expression of adiponectin receptor 1 in olfactory mucosa of mice," *Cell and Tissue Research*, vol. 334, no. 2, pp. 187–197, 2008.
- [23] D. Loch, C. Heidel, H. Breer, and J. Strotmann, "Adiponectin enhances the responsiveness of the olfactory system," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, article e75716, 2013.
- [24] F. Derakhshan and C. Toth, "Insulin and the brain," *Current Diabetes Reviews*, vol. 9, no. 2, pp. 102–116, 2013.
- [25] J. T. Dou, M. Chen, F. Dufour, D. L. Alkon, and W. Q. Zhao, "Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning," *Learning and Memory*, vol. 12, no. 6, pp. 646–655, 2005.
- [26] L. P. van der Heide, G. M. Ramakers, and M. P. Smidt, "Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive," *Progress in Neurobiology*, vol. 79, no. 4, pp. 205–221, 2006.
- [27] Y. Qi, N. Takahashi, S. M. Hileman et al., "Adiponectin acts in the brain to decrease body weight," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 5, pp. 524–529, 2004.
- [28] G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, 4th edition, 1998.
- [29] E. Guillod-Maximin, A. F. Roy, C. M. Vacher et al., "Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons," *Journal of Endocrinology*, vol. 200, no. 1, pp. 93–105, 2009.
- [30] P. Aimé, C. Hegoburu, T. Jaillard et al., "A physiological increase of insulin in the olfactory bulb decreases detection of a learned aversive odor and abolishes food odor-induced sniffing behavior in rats," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, article e51227, 2012.

- [31] A. D. Gaines, "Anosmia and hyposmia," *Allergy and Asthma Proceedings*, vol. 31, no. 3, pp. 185–189, 2010.
- [32] K. K. Cheng, K. S. Lam, B. Wang, and A. Xu, "Signaling mechanisms underlying the insulin-sensitizing effects of adiponectin," *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 28, no. 1, pp. 3–13, 2014.
- [33] H. Sanke, T. Mita, H. Yoshii et al., "Relationship between olfactory dysfunction and cognitive impairment in elderly patients with type 2 diabetes mellitus," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 106, no. 3, pp. 465–473, 2014.
- [34] S. Nagayama, R. Homma, and F. Imamura, "Neuronal organization of olfactory bulb circuits," *Frontiers in Neural Circuits*, vol. 8, p. 98, 2014.
- [35] Z. Wan, D. Mah, S. Simtchouk, A. Klegeris, and J. P. Little, "Globular adiponectin induces a pro-inflammatory response in human astrocytic cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 446, no. 1, pp. 37–42, 2014.
- [36] M. Guthoff, O. Tschritter, D. Berg et al., "A polymorphism in the gene encoding AdipoR1 affects olfactory recognition," *International Journal of Obesity*, vol. 35, no. 6, pp. 873–876, 2011.
- [37] J. Payer, I. Giachetti, A. Holley, and J. Le Magnen, "A selective control of olfactory bulb electrical activity in relation to food deprivation and satiety in rats," *Physiology and Behavior*, vol. 9, no. 4, pp. 573–579, 1972.
- [38] B. H. Liu, P. H. Wang, Y. C. Wang, W. M. Cheng, H. J. Mersmann, and S. T. Ding, "Fasting regulates the expression of adiponectin receptors in young growing pigs," *Journal of Animal Science*, vol. 86, no. 12, pp. 3377–3384, 2014.
- [39] K. Sebeková, K. S. Klenovics, P. Boor et al., "Behaviour and hormonal status in healthy rats on a diet rich in Maillard reaction products with or without solvent extractable aroma compounds," *Physiology & Behavior*, vol. 105, no. 3, pp. 693–701, 2012.
- [40] W. A. Banks, J. B. Owen, and M. A. Erickson, "Insulin in the brain: there and back again," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 136, no. 1, pp. 82–93, 2012.
- [41] S. S. Deepa and L. Q. Dong, "APPL1: role in adiponectin signaling and beyond," *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, vol. 296, no. 1, pp. E22–E36, 2009.