



**EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO  
DEL D-PINITOL COMO MODIFICADOR  
MULTIFACÉTICO EN EL CURSO DE LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Tesis doctoral por compendio de publicaciones

Dina Medina Vera

Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular

Directores: Fernando Rodríguez de Fonseca y Cristina Rosell del Valle

Tutora: Alicia Rivera Ramírez

Facultad de Ciencias  
Universidad de Málaga, 2024







UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



**Universidad de Málaga.**

**Facultad de Ciencias.**

**Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular**

**Línea de Investigación: Neurobiología**

**TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DEL  
D-PINITOL COMO MODIFICADOR MULTIFACÉTICO  
EN EL CURSO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

*Therapeutic Effect Evaluation of D-Pinitol as a Multifaceted Modifier in the  
Course of Alzheimer's Disease*

**Memoria presentada por Dina Medina Vera para optar al  
título de Doctor por la Universidad de Málaga**

Dirección: Fernando Rodríguez de Fonseca y Cristina Rosell del Valle

Tutorización: Alicia Rivera Ramírez


Málaga, 2024





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTORA: Dina Medina Vera

 <https://orcid.org/0000-0002-0342-1287>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)





## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña DINA MEDINA VERA

Estudiante del programa de doctorado **BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR** de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: **EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DEL D-PINITOL COMO MODIFICADOR MULTIFACÉTICO EN CURSO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Realizada bajo la dirección de **FERNANDO RODRÍGUEZ DE FONSECA Y CRISTINA ROSELL DEL VALLE** y tutorización de **ALICIA RIVERA RAMÍREZ**

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 15 de MARZO de 2024

Fdo.: DINA MEDINA VERA Doctorando/a	Fdo.: ALICIA RIVERA RAMÍREZ Tutor/a
Fdo.: FERNANDO RODRÍGUEZ DE FONSECA Y CRISTINA ROSELL DEL VALLE Director/es de tesis	





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**ED-UMA**  
Escuela de Doctorado  
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

## DECLARACIÓN DE LOS DIRECTORES Y TUTOR

### **Dr. D. Fernando Rodríguez de Fonseca**

Investigador senior del programa 'Nicolas Monardes' adscrito al Instituto de Investigación Sanitaria de Málaga, IBIMA.

### **Dra. D<sup>a</sup> Cristina Rosell del Valle**

Responsable de Asuntos Científicos y Regulatorios de la empresa Asphaltion, Departamento Estrategia Reguladora, Desarrollo y Redacción Científica

### **Dra. D<sup>a</sup> Alicia Rivera Ramírez**

Catedrática de Universidad. Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología (área de Biología Celular) de la Universidad de Málaga.

### **CERTIFICAN que D<sup>a</sup>. Dina Medina Vera**

ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra tutela y dirección los datos necesarios para la realización de una Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones, titulada: "EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DEL D-PINITOL COMO MODIFICADOR MULTIFACÉTICO EN EL CURSO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER", que consideramos que las 5 publicaciones aportadas tienen el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar al Grado de Doctor con Mención Internacional.

Y para que conste a todos los efectos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente certificado.

En Málaga, a 15 de Marzo de 2024

Directores: Fernando Rodríguez de Fonseca y Cristina Rosell del Valle

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Tutora: Alicia Rivera Ramírez





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**ED-UMA**  
Escuela de Doctorado  
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

## INFORME DE IDONEIDAD DE LA PRESENTACIÓN POR COMPENDIO DE ARTÍCULOS

### **Dr. D. Fernando Rodríguez de Fonseca**

Investigador senior del programa 'Nicolas Monardes' adscrito al Instituto de Investigación Sanitaria de Málaga, IBIMA.

### **Dra. D<sup>a</sup> Cristina Rosell del Valle**

Responsable de Asuntos Científicos y Regulatorios de la empresa Asphaltion, Departamento Estrategia Reguladora, Desarrollo y Redacción Científica

### **Dra. D<sup>a</sup> Alicia Rivera Ramírez**

Catedrática de Universidad. Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología (área de Biología Celular) de la Universidad de Málaga.

## HACEN CONSTAR QUE

Los 5 artículos científicos que avalan la Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones presentada por D<sup>a</sup>. **Dina Medina Vera** y titulada: "EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DEL D-PINITOL COMO MODIFICADOR MULTIFACÉTICO EN EL CURSO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER", no han sido utilizadas en Tesis anteriores.

Además, los coautores de dichos artículos aceptan la utilización de estos como parte de esta tesis doctoral y rechazan su uso en otras tesis doctorales.

Y para que conste a todos los efectos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente certificado.

En Málaga, a 15 de Marzo de 2024

Directores: Fernando Rodríguez de Fonseca y Cristina Rosell del Valle

Tutora: Alicia Rivera Ramírez





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

El presente trabajo de Tesis Doctoral se ha financiado a través de los siguientes proyectos de investigación:

- Proyecto: **Red De Trastornos Adictivos**. Entidad financiadora: Redes Tematicas De Investigacion Cooperativa En Salud 2016. Número de expediente: RD16/0017/0001. Período de ejecución: 10/01/2019-09/05/2019. Investigador Principal: Rodríguez De Fonseca, Fernando.
- Proyecto: **High fat diet, microbiota and neuroinflammation in the progression of Alzheimer disease (FATZHEIMER)**. Entidad financiadora: Fondo Europeo de Desarrollo Regional-Unión Europea (FEDER-UE) y EULAC Health H2020. Número de expediente: EU-LACH16/T010131. Período de ejecución: 01/10/2019-31/12/2021. Investigador Principal: Rodríguez De Fonseca, Fernando.
- Proyecto: **Alcohol, Depresion Y Deterioro Cognitivo: Papel De Las Aciletanolamidas No Cannabinoides**. Entidad financiadora: Proyectos De Investigación En Salud 2019 (AES 2019), Instituto de Salud Carlos III. Número de expediente: PI19/01577. Período de ejecución: 01/01/2020-31/12/2022. Investigador Principal: Rodríguez De Fonseca, Fernando.
- Proyecto: **Desarrollo de los inositoles d-pinitol y d-chiroinositol como tratamiento de enfermedades que cursan con acumulación de proteína tau fosforilada (tauopathies)**. Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III en la convocatoria de 2022 de Proyectos de Desarrollo Tecnológico en Salud de la Acción Estratégica en Salud 2021-2023. Número de expediente, DTS22/00021. Período de ejecución: 01/01/2023-31/12/2024. Investigador Principal: Rodríguez De Fonseca, Fernando.

D<sup>a</sup> Dina Medina Vera ha realizado dos estancias de investigación durante el desarrollo de su tesis doctoral:

- **Primer período de estancia predoctoral:** del 5 de septiembre de 2020 al 7 de marzo de 2021. Institución: Karolinska Institutet, Center For Alzheimer Research. Bajo la supervisión de la Dra. Erika Bereczki. Financiación: Ayuda de movilidad de la Universidad de Málaga para la realización de Tesis con Mención Internacional.
- **Segundo período de estancia predoctoral:** 7 de diciembre de 2020 al 7 de marzo de 2021. Institución: Karolinska Institutet, Center For Alzheimer Research. Bajo la supervisión de la Dra. Erika Bereczki. Financiación: International Mentoring Foundation for the Advancement of Higher Education (IMFAHE); IMFAHE's Excellence Fellowships 2020.

Esta tesis doctoral en compendio recoge las siguientes publicaciones en las que D<sup>a</sup> Dina Medina Vera figura como autora principal:

1. Dina Medina-Vera, Juan Antonio Navarro, Rubén Tovar, Cristina Rosell-Valle, Alfonso Gutiérrez-Adan, Juan Carlos Ledesma, Carlos Sanjuan, Francisco Javier Pavón, Elena Baixeras, Fernando Rodríguez de Fonseca, Juan Decara **"Activation of PI3K/Akt signaling pathway in rat hypothalamus induced by an acute oral administration of d-pinitol."** *Nutrients* 13, no. 7 (2021): 2268. doi: 10.3390/nu13072268
2. Dina Medina-Vera, Juan Antonio Navarro, Patricia Rivera, Cristina Rosell-Valle, Alfonso Gutiérrez-Adán, Carlos Sanjuan, Antonio Jesús López-Gambero, Ruben Tovar, Juan Suarez, Francisco Javier Pavón, Elena Baixeras, Juan Decara, Fernando Rodríguez de Fonseca. **"d-Pinitol promotes tau dephosphorylation through a cyclin-dependent kinase 5 regulation mechanism: A new potential approach for tauopathies?"** *British journal of pharmacology* 179, no. 19 (2022): 4655-4672. doi: 10.1111/bph.15907
3. Dina Medina-Vera, Antonio Jesús López-Gambero, Juan Antonio Navarro, Carlos Sanjuan, Elena Baixeras, Juan Decara, Fernando Rodríguez de Fonseca. **"Novel insights into D-Pinitol based therapies: a link between tau hyperphosphorylation and insulin resistance."** *Neural Regeneration Research* 19, no. 2 (2024): 289-295. doi: 10.4103/1673-5374.379015
4. Dina Medina-Vera, Emma N. Zambrana-Infantes, Antonio Jesús López-Gambero, Julia Verheul-Campos, Luis J. Santín, Elena Baixeras, Juan Suarez, Francisco J. Pavon, Cristina Rosell-Valle, Fernando Rodríguez de Fonseca. **"Transcending the amyloid-beta dominance paradigm in Alzheimer's disease: An exploration of behavioural, metabolic, and gut microbiota phenotypes in 5xFAD mice."** *Neurobiology of disease* 187 (2023): 106295. doi: 10.1016/j.nbd.2023.106295

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral también se han registrado la siguiente patente en la que D<sup>a</sup> Dina Medina Vera figura como coinventora:

1. Fernando Rodriguez De Fonseca, Juan Antonio Navarro Galera, Elena Baixeras Llanos, Juan Manuel Decara Del Olmo, **Dina Medina Vera**, Antonio Jesús Lopez-Gambero, Juan Suarez Perez, Carlos Sanjuan Merino. **Composition and methods for enhancing or promoting the secretion of ghrelin to promote a healthy metabolic aging.** Fecha de publicación: 10.03.2021. Patente No. EP3789018A1, European Patent Office.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral también se han publicado las siguientes publicaciones en las que D<sup>a</sup> Dina Medina Vera figura como primera autora o coautora:

1. **Dina Medina-Vera**, Antonio Jesús López-Gambero, Julia Verheul-Campos, Juan Antonio Navarro, Laura Morelli, Pablo Galeano, Juan Suárez, Carlos

- Sanjuan, Beatriz Pacheco-Sánchez, Patricia Rivera, Francisco J. Pavon, Cristina Rosell-Valle, Fernando Rodríguez de Fonseca. **"Therapeutic efficacy of the inositol D-Pinitol as a multi-faceted disease modifier in the 5xFAD humanized mouse model of Alzheimer's amyloidosis."** *Under revision*
2. Juan Carlos Ledesma, Marta Rodríguez-Arias, Ana L. Gavito, Ana M. Sánchez-Pérez, José Viña, **Dina Medina Vera**, Fernando Rodríguez de Fonseca, José Miñarro. **"Adolescent binge-ethanol accelerates cognitive impairment and  $\beta$ -amyloid production and dysregulates endocannabinoid signaling in the hippocampus of APP/PSE mice"**. *Addiction Biology*. 2020 Feb 11:e12883. doi: 10.1111/adb.12883.
  3. Patricia Rivera, Antonio Vargas, Antoni Pastor, Anna Boronat, Antonio Jesús López-Gambero, Laura Sánchez-Marín, **Dina Medina-Vera**, Antonia Serrano, Francisco Javier Pavón, Rafael de la Torre, Ekaitz Agirregoitia, María Isabel Lucena, Fernando Rodríguez de Fonseca, Juan Decara, Juan Suárez. **"Differential hepatoprotective role of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors in paracetamol-induced liver injury"**. *British Journal of Pharmacology*. 2020 Mar 13. doi: 10.1111/bph.15051.
  4. Juan A. Navarro, Juan Decara, **Dina Medina-Vera**, Rubén Tovar, Juan Suarez, Javier Pavón, Antonia Serrano, Margarita Vida, Alfonso Gutierrez-Adan, Carlos Sanjuan, Elena Baixeras, Fernando Rodríguez de Fonseca. **"D-Pinitol from *Ceratonia siliqua* Is an Orally Active Natural Inositol That Reduces Pancreas Insulin Secretion and Increases Circulating Ghrelin Levels in Wistar Rats"**. *Nutrients*. 2020 July 8. doi: 10.3390/nu12072030.
  5. **Dina Medina-Vera**, Cristina Rosell-Valle, Antonio J. López-Gambero, Juan A. Navarro, Emma N. Zambrana-Infantes, Patricia Rivera, Luis J. Santín, Juan Suarez, Fernando Rodríguez de Fonseca. **"Imbalance of Endocannabinoid/Lysophosphatidylinositol Receptors Marks the Severity of Alzheimer's Disease in a Preclinical Model: A Therapeutic Opportunity"**. *Biology-Basel*. 2020 November 5. doi: 10.3390/biology9110377.
  6. Antonio J. López-Gambero, Cristina Rosell-Valle, **Dina Medina-Vera**, Juan Antonio Navarro, Antonio Vargas, Patricia Rivera, Carlos Sanjuan, Fernando Rodríguez de Fonseca, Juan Suárez. **"A Negative Energy Balance Is Associated with Metabolic Dysfunctions in the Hypothalamus of a Humanized Preclinical Model of Alzheimer's Disease, the 5XFAD Mouse"**. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 May 20 doi: 10.3390/ijms22105365.
  7. Antonio J. López-Gambero, Beatriz Pacheco-Sánchez, Cristina Rosell-Valle, **Dina Medina-Vera**, Juan Antonio Navarro, María del Mar Fernández-Arjona, Marialuisa de Ceglia, Carlos Sanjuan, Vincent Simon, Daniela Cota, Patricia Rivera, Fernando Rodríguez de Fonseca, Juan Suárez. **"Dietary administration of D-Chiro-inositol attenuates sex-specific metabolic imbalances in the**

- 5x*FAD* mouse model of Alzheimer's Disease".** *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 April. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112994
8. Juan A. Navarro, Juan Decara, **Dina Medina-Vera**, Ruben Tovar, Antonio J. Lopez-Gambero, Juan Suarez, Francisco Javier Pavón, Antonia Serrano, Marialuisa de Ceglia, Carlos Sanjuan, Yolanda Alfonso Baltasar, Elena Baixeras, Fernando Rodríguez de Fonseca. **"Endocrine and Metabolic Impact of Oral Ingestion of a Carob-Pod-Derived Natural-Syrup-Containing D-Pinitol: Potential Use as a Novel Sweetener in Diabetes"**. *Pharmaceutics*. 2022 July 30. doi: 10.3390/pharmaceutics14081594
  9. Juan A. Navarro, Caridad Díaz, Juan Decara, **Dina Medina-Vera**, Antonio J. Lopez-Gambero, Juan Suarez, Francisco Javier Pavón, Antonia Serrano, Antonio Vargas, Ana Luisa Gavito, Oscar Porras-Perales, Jesús Aranda, Francisca Vicente, Carlos Sanjuan, Elena Baixeras, Fernando Rodríguez de Fonseca. **"Pharmacokinetics and Endocrine Effects of an Oral Dose of D-Pinitol in Human Fasting Healthy Volunteers"**. *Nutrients*. 2022 October 1. doi: 10.3390/nu14194094
  10. **Dina Medina-Vera**, Daniela Enache, Simone Tambaro, Ethar Abuhashish, Cristina Rosell-Valle, Bengt Winblad, Fernando Rodriguez de Fonseca, Erika Berezki, Per Nilsson. **"Translational potential of synaptic alterations in Alzheimer's disease patients and App knock-in mice"**. *Brain Communications*. 2023 January 5. doi: 10.1093/braincomms/fcad001
  11. **Dina Medina-Vera**, Hongjing Zhao, Erika Berezki, Cristina Rosell-Valle, Fernando Rodríguez de Fonseca, Per Nilsson, Simone Tambaro. **"The expression of the endocannabinoid receptors CB2 and GPR55 is highly increased during the progression of Alzheimer's disease in AppNL-G-F mice"**. *Biology-Basel*. 2023 May 25. doi: 10.3390/biology12060805
  12. **Dina Medina-Vera**, Antonio J. López-Gambero, Patricia Rivera, Carlos Sanjuan, Elena Baixeras, Juan Decara, Francisco J. Pavon, Cristina Rosell-Valle, Fernando Rodríguez de Fonseca. **"Insulin Signaling and Neurological Disorders: Investigating the Therapeutic Potential of D-Pinitol in Alzheimer's Disease and Tauopathies"**. *Neuroscience Applied Elsevier* Volume 2, Supplement 2, 2023, 103779; doi: <https://doi.org/10.1016/j.nsa.2023.103779> (*ECNP Journal-Conference paper*)
  13. Pablo Galeano, Marialuisa de Ceglia, Mauricio Mastrogiovanni, Lorenzo Campanelli, **Dina Medina-Vera**, Nicolás Campolo, Gisela V. Novack, Cristina Rosell-Valle, Juan Suárez, Adrián Aicardo, Karen Campuzano, Eduardo M. Castaño, Sonia Do Carmo, A. Claudio Cuello, Silvina Bartesaghi, Rafael Radi, Fernando Rodríguez de Fonseca, Laura Morelli. **"The Effect of Fat Intake with Increased Omega-6-to-Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Ratio in Animal Models of Early and Late Alzheimer's Disease-like Pathogenesis"**. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023 Nov 30 doi: 10.3390/ijms242317009.



## **Agradecimientos**

Sin duda es la parte más difícil de escribir. Parece que todo acaba aquí, pero no, toca una parte muy importante y es la de agradecer a todas esas personas que han formado parte de este camino y que han ayudado a que sea posible.

En primer lugar, le doy las gracias a Fernando, mi director, mentor y un investigador extraordinario, además de una persona excepcional. Su influencia ha sido fundamental para darle sentido a toda esta tesis, y ha inculcado en mí la pasión por la investigación como un estilo de vida. Gracias por haber formado este equipo de trabajo excepcional y por mantener vivo ese espíritu de colaboración que nos has transmitido desde el primer momento.

Quiero continuar con Cristina, mi co-directora. Apareciste de repente para formar parte de mi tesis, y me enseñaste las buenas prácticas, la constancia y la metodología que había que tener para llevar a cabo un buen trabajo. Gracias por tu gran corazón y estar siempre dispuesta a ayudar.

Por supuesto mis compañeros se merecen estar aquí como los que más. Gracias a todos los formáis o habéis formado parte del LMR por estos años de trabajo, risas y amistad a vuestro lado. Ojalá todo el mundo tuviera la suerte de contar con vuestro compañerismo y vuestra dedicación.

Además, también quiero agradecer a los compañeros del grupo de cardiología, y por supuesto a Javi y Manolo, por la oportunidad que me han dado de formar parte de ese grupo y hacer posible el llevar dos tesis en paralelo.

I also want to thank Per, Simone, Luis, and Erika for the warm welcome during my stay at the Karolinska Institute. Thank you for making those cold months feel warm. Tack!

Gracias también a todos los amigos que han amenizado este camino. Quiero hacer una especial mención a Patri, Lauras, María, Ada, Ana, Antoñito, Jesús, Óscar, JA y Rubén, porque dejasteis de ser solo compañeros y os convertisteis en amigos. A mis amigos de Barcelona, Pau, Cris, Anna, Marta, Irene, Estela, gracias por estar aún en la distancia. Y por supuesto a mis rumberos: Almu, Ana, Kevin, Johana, Jose y Tamara, que me habéis dado los mejores ratos bailando y riendo en estos últimos años de tesis. Y a mi compañero de aventuras, Andrés, gracias por tu apoyo y risas incondicionales.

Por último, quiero agradecer a mi familia. A mis abuelos, que, aunque no han podido ver esto, sé que estarían muy orgullosos; Mama, Papa, he conseguido mucho más que el cuchibirato. A mis padres Carmen y Antonio, un ejemplo de valentía y amor. A mi hermana MCarmen, mi cuñado Alberto y mis sobrinos Hugo y Dina, que son mi mayor felicidad. Siempre habéis estado ahí en las muchas decisiones que he tenido de cambio de vida. Me habéis apoyado incondicionalmente y me habéis inculcado grandes valores. Os quiero muchísimo a todos.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

*A mi familia, por su apoyo incondicional.*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## Índice

<b>1. Abreviaturas</b> .....	1
<b>2. Índice de figuras</b> .....	3
<b>3. Resumen / Abstract</b> .....	4
<b>4. Introducción</b> .....	5
4.1. Introducción a los trabajos presentados.....	5
4.1.1. Trazando el Camino: D-Pinitol y su Potencial Terapéutico en la Señalización de la Insulina y los Sensores Metabólicos del Hipotálamo .....	6
4.1.2. Eficacia del D-Pinitol frente a la desfosforilación de la proteína tau .....	6
4.1.3. Conexión entre la hiperfosforilación de tau y la resistencia a la insulina .....	7
4.1.4. Explorando nuevos enfoques en la enfermedad de Alzheimer: caracterización en ratones 5xFAD .....	7
4.1.5. Impacto terapéutico del D-Pinitol como modificador multifacético en el modelo de ratón 5xFAD de la enfermedad Alzheimer .....	8
4.2. La enfermedad de Alzheimer .....	9
4.2.1. Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer a nivel mundial y en España .....	9
4.2.2. Fases y clasificación de la enfermedad de Alzheimer .....	11
4.2.3. Enfermedad de Alzheimer familiar .....	14
4.2.4. Enfermedad de Alzheimer esporádica .....	17
4.2.5. Papel de A $\beta$ y tau en la enfermedad de Alzheimer .....	19
4.2.6. Metabolismo del péptido A $\beta$ .....	20
4.2.7. Metabolismo de la proteína tau.....	22
4.2.8. Neuroinflamación.....	26
4.2.9. El Microbioma Intestinal y la enfermedad de Alzheimer .....	31
4.3. Resistencia cerebral a la insulina .....	33
4.3.1. Diabetes mellitus tipo 2 y cascada de señalización de la insulina .....	33
4.3.2. Señalización de la insulina en cerebro .....	35
4.3.3. Conexiones entre la diabetes y enfermedad de Alzheimer .....	37
4.3.4. Taupatía e insulina .....	39
4.4. Los inositoles .....	40
4.4.1. Los inositoles en la vía no canónica de señalización del receptor de insulina....	41
4.4.2. El D-Pinitol como mediador insulínico .....	42
4.4.3. El D-Pinitol contra la EA.....	46
4.5. Estado actual terapia farmacológica de la enfermedad de Alzheimer: de la terapia sintomática a los modificadores del curso de la enfermedad .....	49
4.5.1. Medicamentos para la enfermedad de Alzheimer de leve a moderada.....	51

4.5.2.	Medicamentos para la enfermedad de Alzheimer de moderada a grave .....	54
4.5.3.	Terapias dirigidas a la proteína tau .....	55
4.5.4.	El uso de nutraceúticos en España.....	56
4.6.	Modelos animales de la enfermedad de Alzheimer .....	56
4.6.1.	Neuropatología del modelo 5xFAD .....	59
<b>5.</b>	<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>Metodología</b> .....	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>68</b>
7.1.	Primera publicación. ‘Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway in Rat Hypothalamus Induced by an Acute Oral Administration of D-Pinitol’, 2021.....	69
7.2.	Segunda publicación. ‘D-Pinitol promotes tau dephosphorylation through a cyclin-dependent kinase 5 regulation mechanism: A new potential approach for tauopathies?’, 2022	70
7.3.	Tercera publicación. ‘Novel insights into D-Pinitol based therapies: a link between tau hyperphosphorylation and insulin resistance’, 2023.....	71
7.4.	Cuarta publicación. ‘Transcending the amyloid-beta dominance paradigm in Alzheimer’s disease: An exploration of behavioural, metabolic, and gut microbiota phenotypes in 5xFAD mice’, 2023.....	72
7.5.	Quinta publicación. ‘Therapeutic efficacy of the inositol D-Pinitol as a multi-faceted disease modifier in the 5xFAD humanized mouse model of Alzheimer’s amyloidosis’, 2024	73
<b>8.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>74</b>
8.1.	Limitaciones .....	79
8.2.	Líneas futuras de investigación .....	81
<b>9.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>82</b>
<b>10.</b>	<b>English summary and conclusions</b> .....	<b>83</b>
10.1.	Introduction.....	83
10.2.	Hypotheses and objectives .....	85
10.3.	Main results.....	88
10.4.	Discussion.....	92
10.4.1.	Limitations.....	97
10.5.	Conclusions.....	99
<b>11.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	<b>100</b>
<b>12.</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>122</b>
12.1.	Anexo I.....	122
12.2.	Anexo II.....	123
12.3.	Anexo III.....	124

## 1. Abreviaturas

<b>ADAM</b>	Familia de Desintegrinas y Metaloproteasas
<b>AICD</b>	Dominio C-Terminal Intracelular de Proteína Precursora de Amiloide
<b>Akt</b>	Proteína Quinasa B
<b>AMPK</b>	Proteína Quinasa Activada por 5' AMP
<b>APOE</b>	Apolipoproteína E
<b>APOE ε4</b>	Alelo E4 del Gen APOE
<b>APP</b>	Proteína Precursora de Amiloide
<b>ATP</b>	Adenosín Trifosfato
<b>Aβ</b>	Beta-Amiloide
<b>BACE1</b>	Enzima Beta-Secretasa1
<b>BHE</b>	Barrera Hematoencefálica
<b>C99</b>	Fragmento C-Terminal B
<b>CA1</b>	Cornu Ammonis 1
<b>CDK5</b>	Quinasa Dependiente de Ciclina 5
<b>COX-2</b>	Enzima Ciclooxygenasa-2
<b>Ct</b>	C-Terminal
<b>CTFα/C83</b>	Fragmento C-Terminal A
<b>CTFη</b>	Fragmento C-Terminal H
<b>DCI</b>	D-Chiro-Inositol
<b>DCL</b>	Deterioro Cognitivo Leve
<b>DMT2</b>	Diabetes Mellitus Tipo 2
<b>DPIN</b>	D-Pinitol
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EAAD</b>	Enfermedad de Alzheimer Autosómico Dominante
<b>EII</b>	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
<b>E-MIC</b>	Eje Microbiota-Intestino-Cerebro
<b>ERK</b>	Quinasa Regulada por Señales Extracelulares
<b>FAD</b>	Enfermedad de Alzheimer Familiar
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos de Los Estados Unidos
<b>GLUT1/4/8</b>	Transportador de Glucosa Tipo 1/4/8
<b>GPI</b>	Anclajes Glicosilfosfatidilinositol
<b>GPI-PLD</b>	Fosfolipasa D de Glicosilfosfatidilinositol
<b>Gq</b>	Proteína G Heteromérica
<b>GS</b>	Glicógeno Sintasa
<b>GSK-3β</b>	Glucogeno Sintasa Quinasa 3β
<b>GWAS</b>	Estudios de Asociación del Genoma Completo
<b>HMIT</b>	Transportador Acoplado A Protones
<b>HTZ</b>	Heterocigoto
<b>HZ</b>	Homocigoto
<b>IDE</b>	Enzima Degradadora de Insulina
<b>IGF-1</b>	factor de crecimiento insulínico tipo 1 ( <i>insulin-like growth factor 1</i> )
<b>IL</b>	Interleuquinas
<b>INS-2</b>	Pseudodisacárido de Galactosamina-DPIN
<b>IPG</b>	Inositoles Fosfoglicanos
<b>IR</b>	Receptor de Insulina

## Abreviaturas

<b>IRS</b>	Sustrato del Receptor de Insulina
<b>LCR</b>	Líquido Cefalorraquídeo
<b>LDLR</b>	Receptores de Lipoproteínas de Baja Densidad
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>MAPK</b>	Proteína Quinasa Activada por Mitógeno
<b>MAPT</b>	Proteína Tau Asociada a Microtúbulos
<b>mTOR</b>	Diana de Rapamicina en Células de Mamífero
<b>NFT</b>	Ovillos Neurofibrilares ( <i>neurofibrillary tangles</i> )
<b>NF-κB</b>	Factor de Transcripción Nuclear Kappa B
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartato
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>Nt</b>	N-Terminal
<b>OCDE</b>	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PDHP</b>	Fosfatasa de Piruvato Deshidrogenasa
<b>PDK1</b>	Proteína Quinasa Dependiente de Fosfatidilinositol 1
<b>PET</b>	Tomografías por Emisión de Positrones
<b>PHF</b>	Filamentos Helicoidales Emparejados
<b>PI</b>	Fosfatidilinositoles
<b>PI(4,5)P2</b>	Fosfatidilinositol 4,5-Bifosfato
<b>PI2P</b>	Fosfatidilinositol-2-Fosfato
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3 Quinasa
<b>PIP</b>	Fosfoinosítidos
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol-3,4,5-Fosfato
<b>PKA</b>	Proteína Kinasa A
<b>PLD</b>	Fosfolipasa D
<b>PP2A</b>	Proteína Fosfatasa 2A
<b>PSEN1</b>	Presenilina 1
<b>PSEN2</b>	Presenilina 2
<b>sAPPα</b>	Fragmento α Soluble de Proteína Precursora de Amiloide
<b>sAPPβ</b>	Fragmento β Soluble de Proteína Precursora de Amiloide
<b>sAPPη</b>	Fragmento η Soluble de Proteína Precursora de Amiloide
<b>SEN</b>	Sociedad Española de Neurología
<b>SF</b>	Filamentos Rectos Fuertemente Enrollados
<b>SMIT1/2</b>	Cotransportadores de Sodio Myo-Inositol 1 Y 2
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SEC</b>	Sistema Endocannabinoide
<b>TNF-α</b>	Factor de Necrosis Tumoral-A

## 2. Índice de figuras

<b>Figura 1. Estimación del número de personas con demencia por cada mil habitantes en países específicos.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 2. Continuo de la enfermedad de Alzheimer.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 3. Proceso de agregación de A<math>\beta</math> y formación de placas amiloide.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 4. Patrón de desarrollo de la patología amiloide y la patología de tau en relación con la aparición de demencia..</b>	<b>19</b>
<b>Figura 5. Procesamiento de la Proteína Precursora de Amiloide (APP) en las vías amiloidogénicas y no amiloidogénicas.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 6. Estructura de dominios de la isoforma más larga de la proteína tau humana. ....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 7. El desarrollo de ovillos neurofibrilares de tau (NFTs).....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 8. Impacto de la microbiota intestinal en el eje intestino-cerebro en la salud. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 9. Diagrama esquemático de la señalización de la vía de la proteína quinasa B (Akt) a través del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1). ....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 10. Estructura química de D-Pinitol y D-chiro-inositol. ....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 11. Mecanismo propuesto de acción del D-Pinitol como segundo mensajero en la señalización de la insulina. ....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 12. Ensayos clínicos activos sobre la enfermedad de Alzheimer y demencias relacionadas.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 13. Medicamentos de anticuerpos monoclonales para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. ....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 14. Caracterización fenotípica de modelos de ratón para la enfermedad de Alzheimer.....</b>	<b>61</b>

### 3. Resumen / Abstract

La presente tesis doctoral aborda el potencial terapéutico del nutraceutico D-Pinitol (Caromax®-D-Pinitol (DPIN)) en el contexto de la enfermedad de Alzheimer (EA), centrándose en la atenuación de la resistencia a la insulina cerebral y su relación con dicha enfermedad. El DPIN, un compuesto natural derivado del inositol, se ha utilizado para nuestros estudios de atenuación de la resistencia a la insulina cerebral y su relación con enfermedades crónicas asociadas, como la EA, utilizando modelos preclínicos humanizados de la enfermedad, ratones 5xFAD. En el primer estudio, se investigó el impacto agudo del DPIN en la vía de señalización de la insulina en el hipotálamo de ratas, observando una activación de la misma, respaldando su papel como sensibilizador de la insulina. En el segundo estudio, se examinó la capacidad del DPIN para influir en la fosforilación de la proteína tau, revelando una reducción significativa de dicha fosforilación a través de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5). La revisión bibliográfica realizada en el tercer estudio destacó la conexión entre la hiperfosforilación de tau y la resistencia a la insulina, proponiendo al DPIN como un candidato prometedor para el desarrollo de tratamientos destinados a las tauopatías. Finalmente, el último estudio exploró el impacto terapéutico del DPIN en ratones 5xFAD, demostrando mejoras significativas en la función cognitiva, reducción de la carga de proteína A $\beta$  e hiperfosforilación de tau, normalización de la vía de insulina y protección de la barrera intestinal y el microbioma intestinal. En conjunto, estos resultados respaldan el potencial del DPIN como un modificador multifacético de la EA, capaz de abordar varios aspectos fisiopatológicos de la enfermedad, desde la resistencia a la insulina cerebral hasta la inflamación intestinal, destacando su promesa como tratamiento para esta enfermedad neurodegenerativa.

*The present doctoral thesis addresses the therapeutic potential of the nutraceutical D-Pinitol (Caromax®-D-Pinitol (DPIN)) in the context of Alzheimer's disease (AD), focusing on attenuating cerebral insulin resistance and its relationship with the disease. DPIN, a natural compound derived from inositol, has been used in our studies to attenuate cerebral insulin resistance and its association with chronic diseases such as AD, employing humanized preclinical models of the disease, 5xFAD mice. In the first study, the acute impact of DPIN on insulin signaling pathways in the rat hypothalamus was investigated, revealing its activation, supporting its role as an insulin sensitizer. The second study examined DPIN's ability to influence tau protein phosphorylation, demonstrating a significant reduction in phosphorylation through cyclin-dependent kinase 5 (CDK5). The literature review conducted in the third study highlighted the connection between tau hyperphosphorylation and insulin resistance, suggesting DPIN as a promising candidate for developing treatments targeting tauopathies. Lastly, the final study explored DPIN's therapeutic impact in 5xFAD mice, showing significant improvements in cognitive function, reduction of A $\beta$  protein burden and tau hyperphosphorylation, normalization of insulin signaling pathway, and protection of intestinal barrier and microbiome. Collectively, these findings support DPIN's potential as a multifaceted modifier of AD, capable of addressing various pathophysiological aspects of the disease, from cerebral insulin resistance to intestinal inflammation, underscoring its promise as a treatment for this neurodegenerative disorder.*

## 4. Introducción

### 4.1. Introducción a los trabajos presentados

La presente tesis doctoral se presenta en forma de un compendio que consta de cuatro artículos científicos y una patente registrada. El enfoque principal de esta investigación se ha centrado en el estudio del nutracéutico D-Pinitol, un compuesto natural derivado del inositol proporcionado por la empresa Euronutra S.L. Este producto (Caromax®-D-Pinitol (DPIN)) se ha utilizado para nuestros estudios de atenuación de la resistencia a la insulina cerebral y su relación con enfermedades crónicas asociadas, como la enfermedad de Alzheimer (EA) utilizando modelos preclínicos humanizados de la enfermedad (ratón 5xFAD).

Los nutracéuticos son productos alimenticios que brindan beneficios para la salud, ya sea a través de sus propiedades nutricionales o de los compuestos biológicamente activos que contienen. En el ámbito médico, los nutracéuticos desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la salud al prevenir, tratar o mejorar condiciones específicas de enfermedad, y su utilización está creciendo exponencialmente gracias a su baja toxicidad y accesibilidad, frente a medicamentos específicos mucho más caros y con potenciales efectos adversos.

Se ha identificado que el DPIN se encuentra en plantas tradicionalmente utilizadas en remedios herbales para la diabetes. El DPIN, un compuesto bioactivo con propiedades análogas a la insulina [1,2], se halla de manera natural en plantas como la buganvilla (*Bougainvillea spectabilis*) usada por los Aymaras en Sudamérica, o especialmente en la pulpa de los frutos de algarrobo (*Ceratonia siliqua*) [3], donde se encuentra en elevadas concentraciones. Se postula que su acción se da mediante su integración en glicanos, considerados mediadores de la señalización de la insulina, favoreciendo así la respuesta insulinogénica [4] aunque sus acciones directas no se han descartado.

Aunque la insulina es conocida principalmente por su papel en la regulación del azúcar en sangre y el metabolismo periférico, también desempeña funciones cruciales en el cerebro [5]. La insulina cerebral participa en la regulación del metabolismo de la glucosa, la modulación de la neurotransmisión y la supervivencia celular [6].

La resistencia a la insulina en el cerebro se ha asociado con diversas condiciones neurológicas, especialmente enfermedades neurodegenerativas, y en especial la enfermedad de Alzheimer (EA) [7]. La disminución en la capacidad de las células

cerebrales para responder a la insulina puede contribuir al desarrollo y la progresión de la enfermedad [8]. En este contexto, se plantea la hipótesis de que la EA podría considerarse una forma específica de diabetes en el cerebro (Diabetes tipo 3).

Por tanto, esta tesis doctoral busca explorar el impacto del DPIN, como sensibilizador de insulina, en el cerebro y su capacidad para modificar aspectos fisiológicos relacionados con la EA en modelos animales. A continuación, se presentan los trabajos presentados que avalan esta tesis doctoral:

#### 4.1.1. Trazando el Camino: D-Pinitol y su Potencial Terapéutico en la Señalización de la Insulina y los Sensores Metabólicos del Hipotálamo

DPIN es un inositol natural que tiene la capacidad de activar la vía de la insulina en tejidos periféricos, aunque su efecto en el sistema nervioso central (SNC) no ha sido exhaustivamente estudiado. En este primer estudio (Apartado 7 de Resultados, **7.1**), nos propusimos investigar el impacto agudo del inositol Caromax®-D-Pinitol con el objetivo de examinar su capacidad para modular la vía de señalización de la insulina. La investigación se centró en la cascada de señalización de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) en un modelo de rata después de la administración oral de DPIN. Los resultados indicaron que la administración oral de este inositol tiene actividad farmacológica en el hipotálamo a través de la vía de señalización PI3K y la proteína quinasa B (Akt), y de sus sustratos, sugiriendo una activación de la vía de señalización de la insulina. Este perfil de actividad es coherente con la función de DPIN como sensibilizador de la insulina, respaldado por la observación de una reducción en la concentración circulante de insulina. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que DPIN podría ser considerado como un candidato potencial para el tratamiento de trastornos vinculados a la resistencia cerebral a la insulina, al activar la respuesta insulínica más allá del receptor de insulina.

#### 4.1.2. Eficacia del D-Pinitol frente a la desfosforilación de la proteína tau

Evidencia reciente establece una conexión entre la resistencia cerebral a la insulina y enfermedades neurodegenerativas, donde la proteína tau hiperfosforilada contribuye a la pérdida de células neuronales. En este segundo estudio (Apartado 7 de Resultados, **7.2**), exploramos la posibilidad de que el inositol DPIN, conocido por su acción como sensibilizador de la insulina, pueda influir en el estado de fosforilación de la proteína tau. Examinamos el impacto farmacológico del DPIN en la señalización de la insulina y la fosforilación de tau, centrándonos ahora en el hipocampo de ratas Wistar y Zucker. Para

ello, revisamos nuevamente la vía de la Akt, una de las principales rutas mediadoras de la insulina, así como el estado funcional de quinasas responsables de la fosforilación de tau. Sorprendentemente, nuestros resultados revelaron que el tratamiento oral con DPIN redujo significativamente la fosforilación de tau a través de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5). Los hallazgos de este estudio respaldan la eficacia del DPIN en la desfosforilación de tau, sugiriendo que el DPIN podría considerarse como un nutracéutico prometedor para el desarrollo de tratamientos destinados a las tauopatías.

#### 4.1.3. Conexión entre la hiperfosforilación de tau y la resistencia a la insulina

La EA es un trastorno neurodegenerativo marcado por la acumulación de placas de beta-amiloide ( $A\beta$ ) y la hiperfosforilación de la proteína tau en el cerebro, conduciendo a un deterioro cognitivo progresivo y pérdida de memoria. Entre los diversos factores que contribuyen a la hiperfosforilación de la proteína tau, la resistencia cerebral a la insulina ha surgido como un área de interés crucial. Actualmente, los inositoles, reconocidos por su capacidad como sensibilizadores de la insulina, están siendo considerados como posibles candidatos para el desarrollo de agentes farmacológicos. Esta revisión bibliográfica (Apartado 7 de Resultados, **7.3**) se centra en examinar las interacciones entre los tres elementos clave (EA, proteína tau e inositoles), con el propósito de identificar objetivos potenciales para nuevos modificadores de enfermedades que puedan ofrecer esperanza a la extensa población afectada por esta devastadora patología.

#### 4.1.4. Explorando nuevos enfoques en la enfermedad de Alzheimer: caracterización en ratones 5xFAD

Además de la formación de ovillos neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés: *neurofibrillary tangles*), la hipótesis de la cascada amiloide que conduce al depósito de  $A\beta$  y la formación de las características placas neuríticas, es generalmente aceptada como una explicación de los cambios neuropatológicos en la EA. No obstante, existe un cuestionamiento sobre si la  $A\beta$  es la única causa de estos cambios. Con el propósito de indagar si el deterioro cognitivo en la EA está exclusivamente vinculado a la carga de  $A\beta$  en el cerebro o si otros factores contribuyen a la progresión de la enfermedad, llevamos a cabo una caracterización de un modelo de ratón de la EA caracterizado por una amiloidosis cerebral acelerada gracias a la expresión de un transgen humano con 5 mutaciones frecuentes de EA hereditaria. Para ello (Apartado 7 de Resultados, **7.4**), se emplearon ratones transgénicos 5xFAD heterocigotos (HTZ) y homocigotos (HZ) en

dos grupos de edad distintos, que representan el inicio temprano y tardío de la enfermedad, considerando ambos sexos. Exploramos diversos factores que influyen en la neuropatología, abarcando desde la carga genética, el fenotipo conductual, los marcadores de neuropatología, la fisiología metabólica, la anatomía patológica intestinal y la composición del microbioma intestinal. Los resultados sugieren que el deterioro cognitivo en los ratones 5xFAD no se atribuye exclusivamente a la agregación de A $\beta$ . Otros elementos, como la señalización alterada de PI3K-Akt, las vías metabólicas interrumpidas relacionadas con la insulina y los cambios en la permeabilidad intestinal y el microbioma intestinal, contribuyen a la progresión de la enfermedad. Nuestros hallazgos iluminan la naturaleza compleja de la EA como una enfermedad neurodegenerativa, subrayando la interacción entre la resistencia a la insulina, el aumento en la deposición de A $\beta$  y el microbioma intestinal. Estas percepciones proporcionan una comprensión más profunda de la enfermedad y abren posibles vías para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a estos factores interconectados.

#### 4.1.5. Impacto terapéutico del D-Pinitol como modificador multifacético en el modelo de ratón 5xFAD de la enfermedad Alzheimer

Como demostramos en el artículo previo, la EA se revela como un trastorno complejo que requiere abordar simultáneamente procesos patológicos interrelacionados, más allá de la simple deposición de A $\beta$  en el cerebro. Entre estos procesos, se encuentran la resistencia central a la insulina, la hiperfosforilación de la proteína tau y la inflamación sistémica acelerada debido a la disbiosis del microbiota intestinal originada a partir de un intestino permeable. En este contexto, es esencial explorar intervenciones terapéuticas alternativas capaces de abordar los diversos componentes de la etiología multifacética de la EA. En nuestro último estudio (Apartado 7 de Resultados, **7.5**), quisimos dar un paso adicional al enfocarnos en investigar si la administración oral crónica de DPIN podría revertir la progresión de la enfermedad similar a la EA en ratones 5xFAD. Los resultados revelaron que el tratamiento con DPIN mejoró la función cognitiva y la flexibilidad espacial, redujo el contenido de proteína A $\beta$  e hiperfosforilación de tau en el hipocampo, incrementó la expresión de la enzima degradadora de insulina (IDE), promovió la circulación de hormonas pro-cognitivas como la grelina y la leptina, y normalizó la vía de insulina PI3K/Akt. Además, el DPIN ejerció un efecto protector tanto en la barrera intestinal como en el microbiota intestinal, mitigando el impacto proinflamatorio del intestino permeable observado en los ratones 5xFAD. Concretamente, redujo los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos y la inflamación asociada

a LPS, normalizando la expresión de proteínas de la barrera intestinal, como la claudina-3. Este efecto se asoció con una modulación del microbiota intestinal hacia una composición bacteriana más equilibrada. En resumen, el perfil farmacológico de DPIN respalda su aplicación para reducir el impacto de múltiples factores que contribuyen al deterioro cognitivo en las etapas tempranas de la EA. Estos hallazgos destacan la eficacia terapéutica del DPIN, subrayando su potencial como un modificador de enfermedad para la EA.

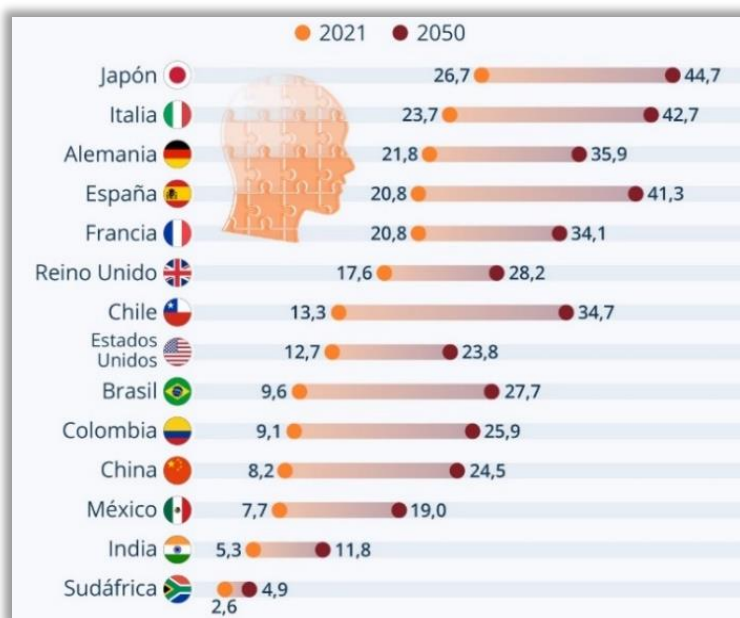
## 4.2. La enfermedad de Alzheimer

A medida que la esperanza de vida de la población aumenta, los trastornos degenerativos vinculados con la edad se hacen más frecuentes, intensificando su impacto sobre la Salud Pública, tanto en el ámbito sanitario como en el socioeconómico. La EA es una patología neurodegenerativa relacionada con la edad, de gran relevancia en el ámbito de la salud que se manifiesta como un desafío clínico y social. Se caracteriza por el deterioro progresivo de las funciones cognitivas y la pérdida de memoria, afectando a millones de personas en todo el mundo e impactando no solo a los individuos que la padecen, sino también a sus familias y comunidades [9]. La singularidad y complejidad de la EA se evidencian en su neuropatología, caracterizada por la acumulación de placas de amiloide y la hiperfosforilación de la proteína tau en el cerebro, lo que conduce a la disfunción neuronal y, en última instancia, al declive cognitivo [10]. A medida que se intensifica la investigación en busca de estrategias de prevención y tratamiento, la comprensión de los múltiples factores que contribuyen a su etiología se torna esencial para abordar de manera efectiva este desafiante problema de salud pública.

### 4.2.1. Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer a nivel mundial y en España

La demencia es un término paraguas que se utiliza para describir un síndrome o grupo de síntomas que afectan a la memoria, el pensamiento y las habilidades sociales [11]. Existe un número elevado de causas hereditarias, tóxicas, infecciosas y ambientales que pueden dar lugar a este síndrome. La demencia más frecuente es la EA, afectando a más de 55 millones de personas en todo el mundo. Cada año se registran cerca de diez millones de nuevos casos, según informa la Organización Mundial de la Salud (OMS) [12]. Además, se prevé que el número total de personas con demencia alcance los 78 millones en 2030 y los 139 millones en 2050 [13] **Figura 1**. El costo anual global de la demencia actualmente supera los 1.3 billones de dólares estadounidenses y se

espera que aumente a 2.8 billones de dólares estadounidenses para el año 2030 según la Federación Internacional Alzheimer's Disease International [14]. La epidemiología de la EA a nivel mundial muestra un panorama de creciente importancia debido al envejecimiento de la población.



**Figura 1. Estimación del número de personas con demencia por cada mil habitantes en países específicos.** La incidencia de demencia está en aumento a nivel global, y en numerosos países las proyecciones indican que podría duplicarse en las próximas tres décadas, según se ilustra en nuestro gráfico. En el caso de España, por ejemplo, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) prevé que en 2050 habrá aproximadamente 41 casos de demencia por cada 1.000 personas, lo que representa un incremento de 20 casos en comparación con 2021. Fuente: Statista. Los casos de demencia podrían ser más frecuentes en el futuro, 2022 [13].

En España, la prevalencia de demencia varía significativamente según la edad y el sexo. Según la Sociedad Española de Neurología (SEN), la EA y otras demencias son la segunda causa específica de muerte en España [15]. En concreto, aproximadamente 1,2 millones de personas padecen actualmente la EA en España, según la asociación Somos Pacientes [16]. Aunque no hay diferencias significativas en la frecuencia de demencias no relacionadas con el Alzheimer entre hombres y mujeres, la EA afecta de manera desigual y con mayor prevalencia a las mujeres [17]. Se ha sugerido que esto podría atribuirse a una combinación de factores biológicos, hormonales e inmunológicos, así como a la mayor esperanza de vida de las mujeres. Según la edad, se observa que el 4,2% de la población de 65 a 74 años padece demencia, mientras que esta cifra se eleva al 12,5% para aquellos de 75 a 84 años y alcanza un notable

27,7% en la población mayor de 85 años. En cuanto al factor de género, se destaca que el 11,1% de las mujeres en España sufre demencia, en comparación con el 7,5% de los hombres. Estos datos reflejan las disparidades en la prevalencia de la demencia en función de la edad y el sexo en la población española [18]. Además, estas cifras aumentarán en los próximos años como consecuencia del progresivo envejecimiento poblacional y el incremento de la esperanza de vida [19]. En España, se prevé que en el año 2049 la esperanza de vida será de 83,1 años para los varones y de 89,9 años para las mujeres [18].

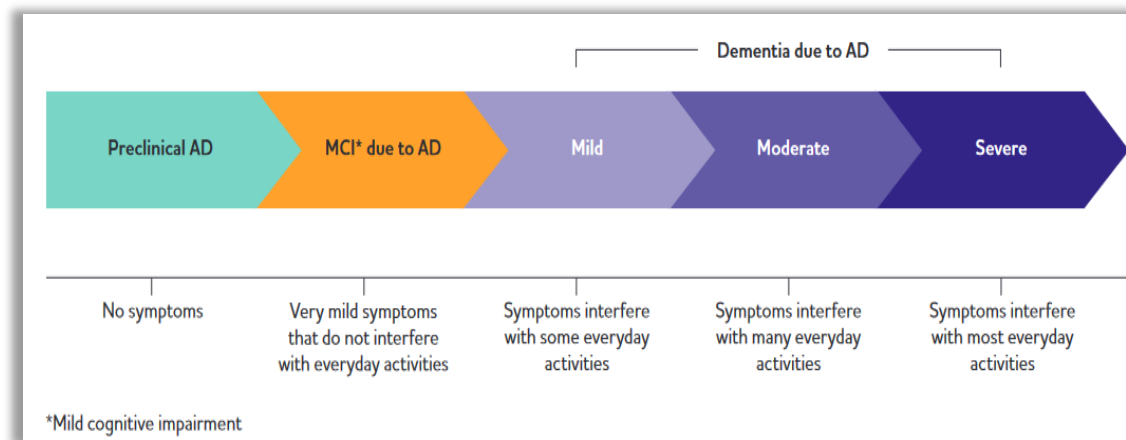
#### 4.2.2. Fases y clasificación de la enfermedad de Alzheimer

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo de etiología compleja que se caracteriza por la acumulación de placas neuríticas (acúmulos de proteína A $\beta$ ) y depósito fibrilar de tau hiperfosforilada en el tejido cerebral [20,21]. Estos cambios patológicos inducen la pérdida gradual de neuronas y sinapsis, que genera un declive en la conectividad neuronal. Esta degeneración cerebral tiene un impacto estructural y funcional en las redes funcionales cerebrales, causando trastornos significativos en la cognición y el comportamiento [22].

Desde una perspectiva neuroanatómica, la EA suele manifestarse inicialmente como una neurodegeneración del lóbulo temporal medial, especialmente en áreas como el hipocampo, crucial para la formación y consolidación de la memoria. Es por ello que, la EA en sus primeras etapas generalmente se manifiesta con problemas de memoria causados por esta neurodegeneración en el lóbulo temporal medial. A medida que progresa la enfermedad, se observa una expansión de la neurodegeneración hacia las cortezas temporal y parietal, afectando gradualmente a extensas regiones corticales [23,24].

Desde el punto de vista clínico, los síntomas iniciales de la EA se centran en trastornos de la memoria, especialmente en la memoria episódica [25]. Los pacientes pueden experimentar dificultades para recordar información reciente, olvidar eventos significativos y tener problemas con la retención de nombres y rostros familiares. Con el avance de la enfermedad, se manifiestan alteraciones en otros dominios cognitivos, como el lenguaje, la capacidad visoespacial, la atención y las funciones ejecutivas [26]. Además, los afectados por la EA pueden experimentar cambios en el comportamiento, como la pérdida de la capacidad para llevar a cabo tareas cotidianas, desorientación temporal y espacial, así como dificultades en la toma de decisiones [27]. Estos síntomas,

en conjunto, generan una carga significativa tanto para los pacientes como para sus cuidadores, destacando la complejidad y gravedad de la EA.



**Figura 2. Continuo de la enfermedad de Alzheimer.** En el continuo de la enfermedad, existen tres fases amplias: la fase preclínica, donde no se perciben síntomas; la fase del deterioro cognitivo leve (DCL) debido a la EA (denominado en inglés como 'mild cognitive impairment' MCI), fase donde se empiezan a notar síntomas leves que no interfieren con la vida diaria del paciente; y la última fase de demencia debido a la EA, dividida a su vez en tres sub-fases: fase leve, los síntomas ya empiezan a interferir en algunas actividades puntuales de la vida del paciente; fase moderada, donde los síntomas alteran ya a la gran mayoría de las actividades diarias; y por último, la fase severa, una última etapa donde la manifestación completa de la enfermedad impide llevar una vida normal al paciente, generando dependencia severa del cuidados. Fuente: Alzheimer's Association Report. Alzheimer's disease facts and figures, 2020 [9].

Además de los síntomas clínicos, la EA se distingue por características patológicas específicas, como fue descrito inicialmente por Alois Alzheimer en 1906 [28]. Se trata de una enfermedad neurodegenerativa definida por la presencia de la proteína A $\beta$ , cuyas variantes se forman a partir del corte de la proteína precursora de amiloide (APP) mediante procesos enzimáticos [29]. El exceso de A $\beta$  generado se acumula y forma placas insolubles entre las células nerviosas y alrededor de los vasos sanguíneos en el cerebro [30,31]. Paralelamente, se observa la acumulación de agregados intracelulares, conocidos como los ovillos neurofibrilares que se forman debido a la acumulación de la proteína tau en una forma hiperfosforilada [32]. Normalmente, la tau estabiliza los microtúbulos en las neuronas, pero en la EA, la tau hiperfosforilada pierde esta función y se agrega formando NFTs dentro de las células nerviosas. Estos NFTs afectan la estructura celular y contribuyen a la degeneración neuronal característica de la EA [33]. Esta dualidad de marcadores patológicos, las placas de A $\beta$  y los NFTs, constituye una firma distintiva de la EA. Estos cambios patológicos comprometen progresivamente la

estructura y función cerebral, contribuyendo a la degeneración neuronal y, consecuentemente, a la manifestación de los síntomas clínicos asociados con la enfermedad.

La EA es generalmente una enfermedad progresiva y degenerativa del cerebro que empeora con el tiempo. En el continuo de la enfermedad, existen tres fases amplias: la fase preclínica, el deterioro cognitivo leve (DCL) y la demencia [34–36] (**Figura 2**). Aunque se conoce que la EA empieza por la fase preclínica y termina con la demencia por Alzheimer grave, la duración que las personas pasan en cada parte del continuo varía. La longitud de cada fase está influida por la edad, la genética, el género y otros factores [37].

#### 4.2.2.1. *Enfermedad de Alzheimer Preclínica*

En esta etapa, los sujetos presentan cambios medibles en su cerebro que indican los primeros signos de la EA (biomarcadores), pero aún no han desarrollado síntomas como la pérdida de memoria [9]. Los niveles anormales de A $\beta$ , observados en las tomografías por emisión de positrones (PET) y el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR), así como la disminución del metabolismo de la glucosa, son dos ejemplos de cambios cerebrales medibles. El cerebro compensa los primeros cambios de Alzheimer, permitiendo que las personas sigan funcionando normalmente. Es importante señalar que no todos los individuos con evidencia de cambios cerebrales relacionados con el Alzheimer desarrollan síntomas de DCL o demencia debido al Alzheimer [38,39]. Por ejemplo, algunos individuos presentan placas de A $\beta$  en el momento del fallecimiento, pero no experimentaron problemas de memoria o cognición durante su vida; tal como se describe en el artículo de Arboleda-Valasquez sobre la mutación *Christchurch* que permitió establecer la necesidad de una taupatía para que el deterioro cognitivo se manifestase [40].

#### 4.2.2.2. *DCL debido a la enfermedad de Alzheimer*

Las personas con DCL debido a la enfermedad de Alzheimer presentan evidencia de biomarcadores de cambios cerebrales asociados con el Alzheimer (por ejemplo, niveles anormales de A $\beta$ ) además de problemas sutiles de memoria y pensamiento. Estos problemas cognitivos pueden ser perceptibles para familiares y amigos, pero no para otros, y no interfieren con la capacidad de las personas para llevar a cabo actividades cotidianas. Los cambios leves en las habilidades cognitivas ocurren cuando el cerebro ya no puede compensar el daño y la muerte de las células nerviosas causado por la EA [9]. Las nuevas técnicas diagnósticas ultrasensibles como SIMOA están permitiendo detectar en fluidos corporales (plasma, líquido cefalorraquídeo) la presencia tanto de

especies de A $\beta$ , como tau fosforilada o cadenas ligeras de neurofilamentos que podrían ayudar al diagnóstico temprano de esta fase de la enfermedad [41].

#### 4.2.2.3. Demencia Debido a la enfermedad de Alzheimer

La demencia debido a la EA se caracteriza por síntomas notables de pérdida de memoria, problemas de pensamiento o conductuales que afectan la capacidad de una persona para funcionar en la vida diaria, junto con evidencia de cambios cerebrales relacionados con el Alzheimer. Las personas con demencia por Alzheimer experimentan múltiples síntomas que cambian a lo largo de un período de años. Estos síntomas reflejan el grado de daño a las células nerviosas en diferentes partes del cerebro. La velocidad a la que los síntomas de la demencia avanzan de leve a moderada y luego a grave varía de una persona a otra [9]. Este curso idiosincrático de la enfermedad es un elemento fundamental en su abordaje, dado que puede condicionar la rapidez con la que la enfermedad avanza hacia la demencia y la discapacidad. Modificar este curso idiosincrático para enlentecerlo es uno de los retos terapéuticos actuales, generándose una nueva clase de medicamentos (*disease modifiers*, o modificadores del curso de la enfermedad), como las modernas inmunoterapias de las que hablaremos más adelante.

Los casos de EA se clasifican comúnmente según la edad de inicio de los síntomas distintivos y los antecedentes familiares del paciente. Cuando los síntomas se manifiestan entre los 30 y 50 años, se denomina EA de inicio temprano o familiar (conocida en inglés como 'early-onset Alzheimer's Disease (EOAD)'). En cambio, si la aparición de los síntomas ocurre a partir de los 60 años, se cataloga como EA de inicio tardío o esporádica. Por tanto, EA puede categorizarse en función de variantes genéticas, edad de inicio y fenotipo clínico, dividiéndose en EA familiar (o autosómica dominante) y EA esporádica.

#### 4.2.3. Enfermedad de Alzheimer familiar

La EA de inicio temprano o familiares, también llamada EA autosómico dominante (EAAD), son la forma hereditaria de la enfermedad descrita por Alois Alzheimer. Este tipo de Alzheimer está asociado con mutaciones en genes específicos, lo que aumenta considerablemente el riesgo de desarrollar la enfermedad. A pesar de ello, la baja prevalencia representando menos del 1-6% de todos los casos de EA, indica que esta forma específica de EA familiar es poco frecuente en comparación con otras formas de la enfermedad [42,43]. La EA familiar, se caracteriza por la presencia de una mutación monogénica en uno de tres genes: el gen para la *APP*, que codifica la proteína

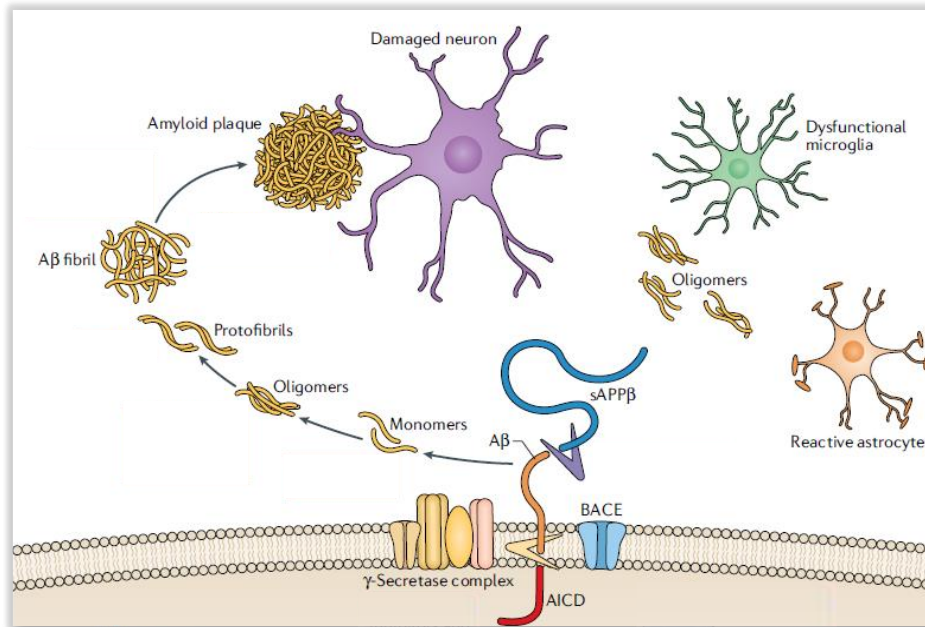
precursora de amiloide, y los genes *PSEN1* y *PSEN2*, que codifican para las proteínas presenilina 1 y 2, respectivamente [44,45].

La APP es una proteína transmembrana que desempeña varios roles fisiológicos en el cuerpo. Aunque es más conocida por su implicación en la EA debido a la formación de placas de amiloide (**Figura 3**) [46], la función normal de la APP es esencial para diversas actividades celulares [47]. La APP está involucrada en la regulación de la formación y el mantenimiento de las sinapsis, las conexiones entre las neuronas, contribuyendo a la plasticidad sináptica, crucial para el aprendizaje y la memoria [48]. Además, participa en procesos de desarrollo celular, incluido el crecimiento y la diferenciación celular, influyendo en la proliferación celular y la formación de nuevas células. También se implica en la adhesión celular, siendo esencial para la interacción y comunicación entre células, y juega un papel en la adhesión y migración celular durante el desarrollo y la reparación tisular [49]. La APP puede tener funciones neuroprotectoras al estar involucrada en la respuesta celular al estrés y la lesión neuronal, ayudando a las células a enfrentar condiciones adversas. Es fundamental comprender que, aunque la APP tiene funciones fisiológicas normales, su procesamiento anormal puede dar lugar a la acumulación de placas de amiloide, un marcador característico de la EA [47].

Las proteínas codificadas por los genes *PSEN1* y *PSEN2* desempeñan funciones clave en la célula, principalmente en el sistema nervioso. Su principal papel es participar en el procesamiento normal de la APP, mediante su integración en el complejo enzimático  $\gamma$ -secretasa. Este procesamiento es esencial para la función celular regular como se ha descrito anteriormente. Además, estas proteínas regulan la señalización celular, contribuyen al desarrollo neuronal, y mantienen la homeostasis del calcio dentro de las células. De nuevo, es importante destacar que, aunque estas funciones son parte de la fisiología normal, mutaciones en los genes *PSEN1* y *PSEN2* pueden llevar a un procesamiento anormal de la APP, contribuyendo así al desarrollo de formas hereditarias de la EA [50]. Las alteraciones genéticas en *PSEN1* son la causa más frecuente de la forma hereditaria temprana del Alzheimer. Se estima que estas mutaciones en *PSEN1* contribuyen aproximadamente al 80% de los casos de EAAD causados por un solo gen. Por otro lado, las mutaciones en *PSEN2* son bastante infrecuentes, con solo alrededor de 30 identificadas en familias con EAAD [43].

Más allá de las mutaciones que causan la enfermedad en APP y las presenilinas, las variaciones genéticas comunes en el gen de la *apolipoproteína E (APOE)* representan el factor de riesgo genético más significativo para la EA [51,52]. APOE es una proteína

lipídica con diversas funciones biológicas que varían según el tipo de célula y tejido en el que se exprese; se encuentra en niveles elevados en el hígado, cerebro y células inmunitarias periféricas, como los monocitos y macrófagos [53]. En líneas generales, APOE cumple funciones fundamentales en el organismo, siendo su papel principal la regulación del metabolismo lipídico y el transporte de colesterol [54]. En el SNC, los astrocitos son los principales productores de APOE en condiciones normales y la transportan hacia las neuronas mediante los receptores de APOE, que pertenecen a la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) [55]. Desempeña un papel clave en el transporte de colesterol hacia las neuronas, participando en la regulación de la homeostasis lipídica cerebral y la plasticidad sináptica. En situaciones de estrés, tanto las neuronas como las células de microglía también pueden producir APOE, cumpliendo funciones inmunomoduladoras y de reparación y mantenimiento celular [56].



**Figura 3. Proceso de agregación de Aβ y formación de placas amiloide.** El péptido Aβ, una vez escindido de la proteína APP por la acción de las enzimas específicas (que constituyen el complejo γ-secretasa y que incluye a las presenilinas), es propenso a plegarse mal y a autoagregarse. Los monómeros Aβ mal plegados se agregan en pequeños oligómeros solubles, que ya son capaces de activar procesos inflamatorios y degenerativos. Los monómeros pueden sufrir agregación secuencial formando oligómeros insolubles, protofibrillas, fibrillas insolubles y, finalmente, placas neuríticas que alteran la sinapsis neuronal y generan una respuesta inmune derivando en la activación de astrocitos y microglías, implicados en la eliminación de Aβ. Fuente: editado de *Nature Reviews Neurology. A critical appraisal of amyloid-β-targeting therapies for Alzheimer disease* [46].

#### 4.2.4. Enfermedad de Alzheimer esporádica

Por otro lado, la EA esporádica o de inicio tardío se refiere a la forma más común de la EA y se caracteriza por su aparición en individuos sin antecedentes familiares significativos de la enfermedad. A diferencia de la EAAD, que tiene una base genética clara y suele manifestarse en edades más tempranas, la EA esporádica ocurre de manera más común en personas mayores y no parece estar directamente ligada a factores genéticos heredados de forma dominante. Constituye la gran mayoría, alrededor del 94-99%, de los casos de EA, manifestándose con síntomas generalmente a partir de los 60-65 años. La frecuencia de esta forma de Alzheimer tiende a aumentar a medida que las personas avanzan en el rango de edad [57,58].

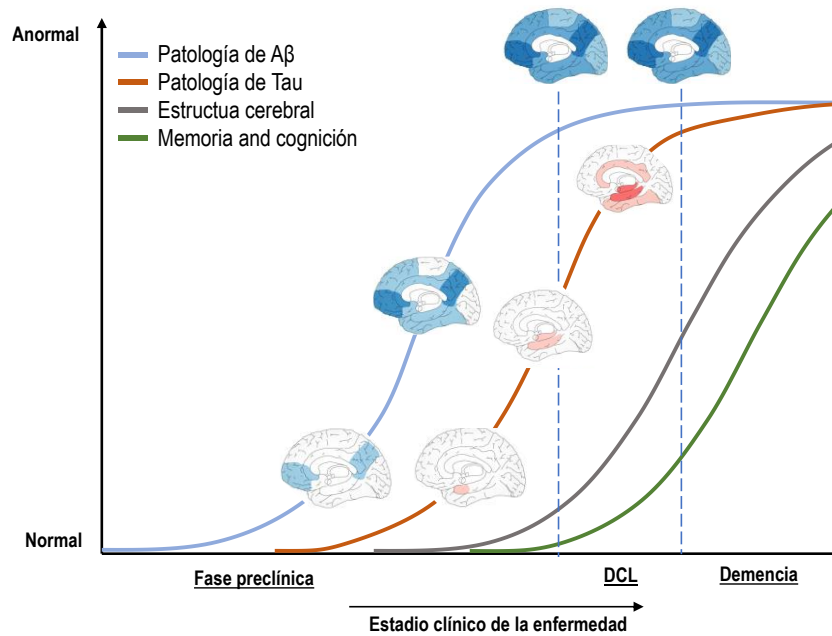
La EA esporádica es multifactorial y se cree que está influida por una combinación de factores ambientales y de estilo de vida, comorbilidad con otras enfermedades y la presencia de ciertos polimorfismos en genes concretos [59]. Aquí se destacan algunos de los principales factores que afectan a la EA esporádica:

1. **Edad:** El envejecimiento es el factor de riesgo más significativo para la EA esporádica. A medida que las personas envejecen, aumenta la probabilidad de desarrollar la enfermedad [60].
2. **Genética:** Aunque no tan determinante como en la EAAD, la genética sigue desempeñando un papel en la EA esporádica. La presencia del alelo *APOE ε4* del gen *APOE* se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, modificando la edad de inicio tanto en la EA tanto de inicio temprano como tardío. Además, recientes estudios de asociación del genoma completo (GWAS) a gran escala han encontrado hasta 75 loci cromosómicos de riesgo para la EA y otras demencias relacionadas, identificando y seleccionando hasta 55 genes de riesgo [21,57].
3. **Factores de estilo de vida:** Estilos de vida poco saludables, como una dieta desequilibrada, falta de actividad física, fumar y consumo excesivo de alcohol, pueden contribuir al riesgo de desarrollar la EA esporádica [59].
4. **Condiciones de salud cardiovascular:** Factores que afectan la salud del corazón, como la hipertensión arterial, la diabetes y el colesterol alto, también pueden aumentar el riesgo de desarrollar la EA [61].
5. **Traumatismo craneal:** Lesiones traumáticas en la cabeza, especialmente aquellas que involucran pérdida de conciencia, se han vinculado a un mayor riesgo de desarrollar la EA esporádica [62].

6. **Reserva cognitiva:** La educación podría contribuir a la reserva cognitiva, que se refiere a la capacidad del cerebro para resistir los efectos del daño cerebral. Se sugiere que las personas con niveles más altos de educación pueden tener una mayor reserva cognitiva, lo que podría retrasar la aparición de los síntomas de la enfermedad [63].
7. **Estimulación cognitiva:** La participación en actividades intelectuales y cognitivamente estimulantes asociadas con niveles educativos más altos podría tener un impacto positivo en la salud cerebral y la función cognitiva a lo largo del tiempo [63,64].
8. **Acceso a recursos de salud y estilo de vida:** Las personas con mayor educación a menudo tienen un mayor acceso a información sobre la salud y adoptan estilos de vida más saludables, lo que puede tener un impacto positivo en la prevención de la enfermedad [64].
9. **Sueño:** Los problemas crónicos de sueño, como la apnea del sueño o la falta de sueño regular, pueden tener un impacto negativo en la salud cognitiva y aumentar el riesgo de deterioro cognitivo y demencia, incluida la EA. La falta de sueño adecuado puede interferir con procesos biológicos importantes, como la eliminación de productos de desecho en el cerebro durante el sueño profundo. Este proceso es esencial para mantener la salud cerebral y se ha relacionado con la acumulación de placas A $\beta$  [65]. Durante el sueño, se produciría una apertura de un sistema de evacuación de residuos, sistema glinfático, formado por las prolongaciones perivasculares de los astrocitos, que permitiría eliminar entre otros oligómeros A $\beta$  y otros compuestos neurotóxicos.
10. **Estrés:** el estrés crónico puede influir en la salud cerebral y aumentar el riesgo de desarrollar EA. El estrés crónico puede desencadenar respuestas inflamatorias en el cuerpo y afectar la función del sistema inmunológico. La inflamación crónica y una respuesta inmunológica desregulada se han asociado con procesos que contribuyen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Además, niveles elevados de cortisol, una hormona liberada en respuesta al estrés, se han asociado con la reducción del tamaño del hipocampo, una región cerebral clave para la memoria. Cambios en estas áreas pueden contribuir a la aparición de síntomas [66].
11. **Permeabilidad intestinal y neuroinflamación:** La permeabilidad intestinal aumentada puede facilitar la translocación de bacterias, productos microbianos y moléculas inflamatorias al sistema circulatorio, desencadenando una respuesta inflamatoria sistémica que puede contribuir a la neuroinflamación y la disfunción cognitiva [67].

4.2.5. Papel de A $\beta$  y tau en la enfermedad de Alzheimer

En el contexto celular y molecular de la EA, se destacan dos eventos distintivos: la acumulación de depósitos extracelulares de placas del péptido A $\beta$  y la formación intracelular de NFTs compuestos por la proteína tau, que se une a los microtúbulos [64]. Estos fenómenos son evidentes a lo largo de todo el curso de la patología y se manifiestan años antes de que aparezcan los síntomas cognitivos. Esto implica que las alteraciones a nivel celular y molecular, como la acumulación de placas A $\beta$  y los NFTs de tau, están presentes en el cerebro mucho antes de que la persona comience a experimentar problemas de memoria u otras dificultades cognitivas típicas de la EA (Figura 4) [68].



**Figura 4. Patrón de desarrollo de la patología amiloide y la patología de tau en relación con la aparición de demencia.** El patrón de desarrollo en el cerebro de la neuropatología amiloide y la de tau se asocia a la aparición del deterioro cognitivo. La formación de grupos solubles de A $\beta$  tiene un efecto negativo en el sistema nervioso, lo que puede resultar en problemas con el funcionamiento de las neuronas. Esto activa proteínas particulares, como la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3 $\beta$ ) y la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5), que causan una hiperfosforilación de tau y alteran la estructura de las células nerviosas. En última instancia, la formación de ovillos neurofibrilares (NFTs) de tau provoca neurodistrofia, que es visible alrededor de las áreas afectadas, y una respuesta inflamatoria del sistema nervioso que activa células microgliales y genera astrocitos reactivos. La patología amiloide comienza en áreas específicas del cerebro antes de la formación de NFTs. Por otro lado, la patología de tau comienza más tarde, afectando primero una región del cerebro y luego expandiéndose gradualmente a otras áreas. Fuente: elaboración propia.

Se han propuesto numerosas hipótesis para explicar el origen neuropatológico de la EA. Sin embargo, estas hipótesis enfrentan desafíos crecientes al no lograr dilucidar completamente la etiopatogenia de esta debilitante enfermedad. La ampliamente aceptada "hipótesis de la cascada amiloide" sugiere que la acumulación de péptidos insolubles de A $\beta$ , que lleva a la formación de placas seniles en el SNC, es un factor clave [69]. Sin embargo, se está cuestionando el papel del péptido A $\beta$  como la única causa de estos cambios. Además, se implica la hiperfosforilación de la proteína tau y la subsiguiente deposición de NFTs [40].

El hipocampo es una región gravemente afectada en individuos con la EA. Está bien establecido que la formación hipocampal está involucrada en procesos de memoria y es particularmente vulnerable al daño causado por respuestas inflamatorias anormales y estrés oxidativo. Los estudios post mortem han revelado de manera consistente la deposición de placas amiloides en la formación hipocampal, especialmente en regiones como el cornu ammonis 1 (CA1), subículo y cortex entorrinal [38,70]. Sin embargo, no solo la presencia de depósitos de A $\beta$ , sino también la progresión de aparición de NFTs, podrían predecir disminuciones en la función cognitiva y pérdida de memoria en sujetos con EA [68].

#### 4.2.6. Metabolismo del péptido A $\beta$

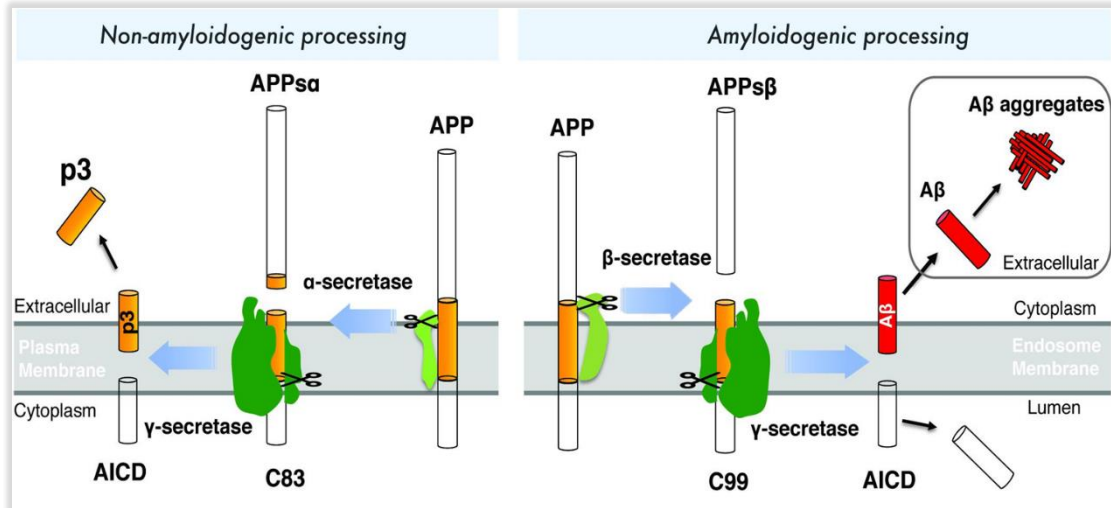
La formación del péptido A $\beta$  se origina a partir del procesamiento proteolítico de la proteína A $\beta$ PP (también conocida como APP) por la acción secuencial de dos enzimas:  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas [50]. Este proceso genera fragmentos de A $\beta$  que varían en longitud, específicamente de 36 a 43 aminoácidos, y se les asigna un nombre según la secuencia de aminoácidos que los componen. Las formas más tóxicas de estos fragmentos son A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 [71]. En las neuronas, la APP recién sintetizada en el aparato de Golgi es transportada directamente a lo largo del axón hacia los terminales sinápticos, donde se integra en la superficie celular [72]. Es en estos terminales donde continúa su procesamiento, que puede seguir dos vías: una no amiloidogénica, que produce fragmentos solubles de APP llamados sAPP $\alpha$ , y otra amiloidogénica, que genera fragmentos de péptidos A $\beta$  [73].

El procesamiento no amiloidogénico, que es predominante en condiciones fisiológicas, involucra a la  $\alpha$ -secretasa, una proteína de la familia de desintegrinas y metaloproteasas (ADAM). La  $\alpha$ -secretasa realiza una escisión en la secuencia del péptido A $\beta$ , evitando su formación. Esto conduce a la liberación de una secuencia peptídica soluble llamada sAPP $\alpha$  al medio extracelular, que actúa como ligando del receptor de Notch y participa

en procesos celulares como la supervivencia y el crecimiento de neuritas [49]. Durante este proceso, queda anclado a la membrana el fragmento restante, conocido como C83 o fragmento C-terminal  $\alpha$  (CTF $\alpha$ ). Este fragmento es luego procesado por la  $\gamma$ -secretasa, que realiza una escisión en el aminoácido 40 o en el 42, liberando un péptido soluble llamado p3. El fragmento restante, conocido como dominio C-terminal intracelular de APP (AICD), se internaliza y se dirige al núcleo celular, donde actúa como un factor de transcripción [74]. Este conjunto de eventos está representado en la **Figura 5** [75].

En la vía amiloidogénica del procesamiento de la APP, se inicia con la acción de la  $\beta$ -secretasa, especialmente la isoforma BACE1, que escinde la APP generando el péptido soluble sAPP $\beta$  y el fragmento C99. Este fragmento es posteriormente procesado por la  $\gamma$ -secretasa, produciendo el péptido A $\beta$ , liberado al espacio extracelular, y el fragmento AICD [76]. La escisión de la  $\beta$ -secretasa está facilitada por la  $\delta$ -secretasa proamiloidogénica. La  $\delta$ -secretasa, liberada al medio extracelular, se asocia con la APP y, tras la internalización en un endosoma, escinde la APP, liberando formas solubles de APP y facilitando la acción de la  $\beta$ -secretasa [50]. La  $\gamma$ -secretasa, formada por varias subunidades, realiza la escisión final del fragmento C99, generando predominantemente los fragmentos A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42, siendo este último más propenso a formar agregados neurotóxicos [77]. Este procesamiento amiloidogénico tiene lugar en endosomas mediados por clatrina y se sugiere que la  $\delta$ -secretasa podría estar implicada en la hiperfosforilación de tau asociada a la proteína fosfatasa 2A (PP2A) [78].

Además de las dos vías mencionadas anteriormente, se identificó en 2015 una ruta alternativa en el procesamiento de la APP en condiciones normales. Esta ruta implica la actividad principal de la  $\eta$ -secretasa, seguida por las  $\alpha$ -secretasa,  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa [79]. Esta vía de procesamiento se activa en mayor medida cuando se inhibe la vía de la  $\beta$ -secretasa. La  $\eta$ -secretasa, distinguida por su capacidad para escindir la APP en un lugar diferente a las secretasas previamente mencionadas, es una metaloproteínasa de matriz de tipo membrana. La  $\eta$ -secretasa corta la APP en un aminoácido fuera de los sitios de corte de la  $\alpha$ -secretasa y la  $\beta$ -secretasa, liberando un péptido soluble sAPP $\eta$  más pequeño. La mayor parte de la proteína APP restante queda anclada a la membrana como el fragmento C-terminal CTF $\eta$ . Luego, la  $\alpha$ -secretasa escinde este fragmento, liberando el péptido amiloide A $\eta\alpha$ , que contiene parte de la secuencia del péptido A $\beta$ . Alternativamente, la  $\beta$ -secretasa puede realizar esta escisión, dando lugar al péptido más pequeño llamado A $\eta\beta$  [80].

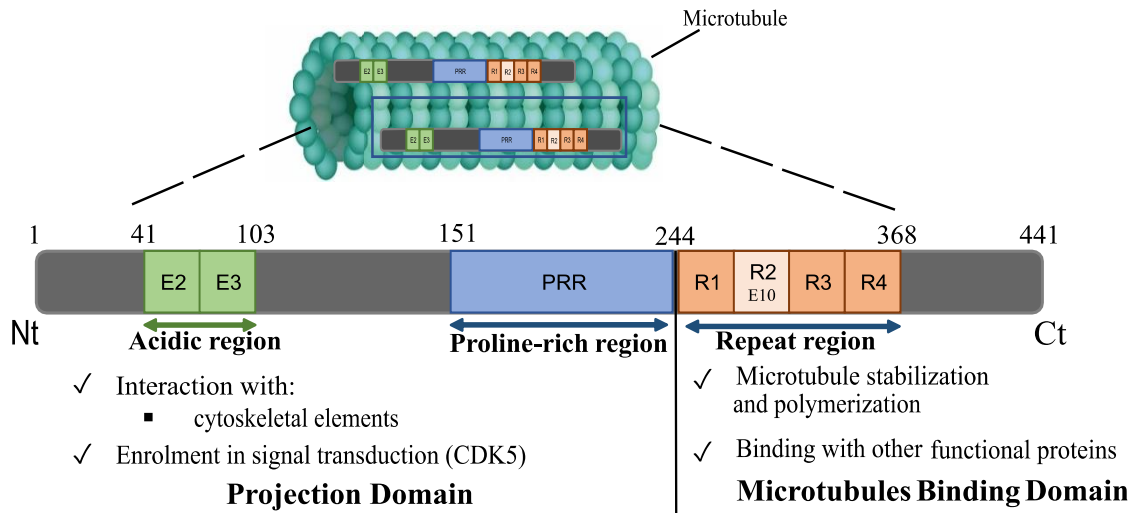


**Figura 5. Procesamiento de la Proteína Precursora de Amiloide (APP) en las vías amiloidogénicas y no amiloidogénicas.** En la ruta no amiloidogénica, la  $\alpha$ -secretasa inicia el proceso generando un fragmento sAPP $\alpha$ , que participa en la supervivencia celular y el crecimiento de neuritas. Esto deja unido a la membrana un fragmento C83, posteriormente dividido por la  $\gamma$ -secretasa, produciendo un fragmento p3 liberado al medio extracelular y un fragmento AICD que actúa como factor de transcripción. En cambio, la vía amiloidogénica comienza con la  $\beta$ -secretasa, que escinde la APP, generando un sAPP $\beta$ . Esto deja anclado a la membrana un fragmento C99, que es posteriormente dividido por la  $\gamma$ -secretasa, produciendo un péptido A $\beta$  (A $\beta$ 1-40 o A $\beta$ 1-42), según el aminoácido escindido, liberado al medio extracelular, y un fragmento AICD. APP: Proteína Precursora de Amiloide; C83: fragmento C-terminal  $\alpha$ ; C99: fragmento C-terminal  $\beta$ ; sAPP $\alpha$ : fragmento  $\alpha$  soluble de APP; sAPP $\beta$ : fragmento  $\beta$  soluble de APP. Fuente: *Frontiers in Molecular Neuroscience. Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease* [75].

#### 4.2.7. Metabolismo de la proteína tau

La tau es una proteína que desempeña un papel crucial en la estabilización de microtúbulos, que son estructuras celulares fundamentales para el mantenimiento de la forma y función de las neuronas y el transporte axonal. Tau está predominantemente presente en el citoplasma axonal de las neuronas, pero también se encuentra en menor medida en astrocitos y oligodendrocitos, células del sistema nervioso gliales. La función principal de tau es ensamblar y estabilizar los monómeros de tubulina en microtúbulos, promoviendo así la polimerización de la tubulina para el crecimiento axonal y el transporte rápido a lo largo del axón [81].

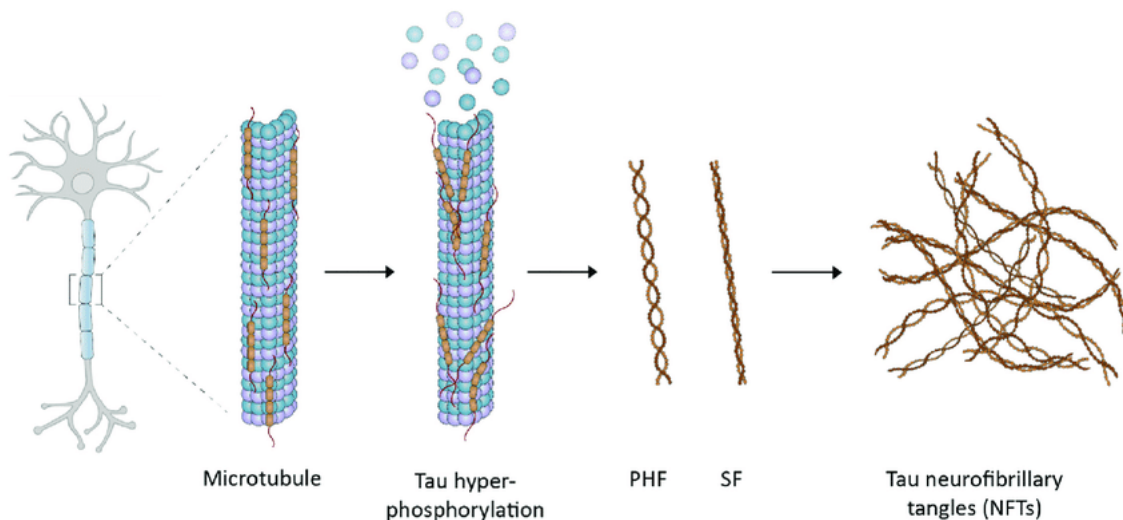
## Introducción



**Figura 6. Estructura de dominios de la isoforma más larga de la proteína tau humana.** Las isoformas de tau se generan a partir del gen MAPT (proteína tau asociada a microtúbulos) y tienen diferencias en la longitud y la composición de aminoácidos. Las principales isoformas de tau en humanos son generalmente clasificadas en seis grupos, según la presencia de cero, uno o dos insertos N-terminales (Nt). Además, cada grupo puede tener variantes con diferentes combinaciones de exones y, por lo tanto, diferentes tamaños y propiedades funcionales. La isoforma más larga de la proteína tau en humanos es conocida como 2N4R, lo que significa que tiene dos insertos Nt (codificados por los exones E2 y E3) y cuatro repeticiones de microtúbulos (R2 codificado por el exón E10). Esta isoforma particular es una de las variantes más completas y grandes de la proteína tau. El dominio de proyección incluye una región ácida y una región rica en prolina, e interactúa con elementos citoesqueléticos y la membrana plasmática neural. Esta parte Nt también está involucrada en las vías de transducción de señales al interactuar con proteínas como la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5). El dominio de unión a microtúbulos en el extremo C-terminal (Ct) es donde la tau se une a los microtúbulos a través de regiones repetitivas, regulando la tasa de polimerización de los microtúbulos y también uniendo otras proteínas funcionales como la fosfatasa de proteína 2A (PP2A). Fuente: modificación de Figura 1 del artículo Dina Medina-Vera et al. [82] que se encuentra en el Apartado 7 de Resultados, 7.2.

Tau tiene dos dominios funcionales principales. El primero está en la región de proyección N-terminal, que sobresale de los microtúbulos a los que tau está unido. Esta región interactúa con elementos citoesqueléticos y permite interacciones con la membrana plasmática neural [83]. El segundo dominio se encuentra cerca de su región C-terminal y consiste en un dominio a través del cual tau se une a los microtúbulos. Este dominio de unión a microtúbulos contiene las regiones repetitivas (R3 o R4) que regulan la tasa de polimerización de los microtúbulos [84]. Este dominio de tau en su porción C-terminal contiene residuos de lisina cargados positivamente, lo que facilitaría su unión a los microtúbulos cargados negativamente (**Figura 6**).

Una de las modificaciones más relevantes de tau es su fosforilación. El estado de fosforilación de tau desempeña un papel crucial en la regulación de sus funciones fisiológicas. Es importante destacar que, bajo condiciones normales y demandas fisiológicas específicas, tau se fosforila y desfosforila alternativamente para regular tanto el ensamblaje de los microtúbulos como el tráfico a lo largo de los axones. De hecho, el ensamblaje de los microtúbulos depende, en parte, del estado de fosforilación, ya que las proteínas tau no fosforiladas son menos efectivas en la polimerización de microtúbulos que las formas fosforiladas [85]. Por lo tanto, la fosforilación de tau debe ser finamente controlada por un equilibrio ajustado entre quinasas y fosfatasa, las enzimas responsables de la fosforilación y desfosforilación, respectivamente [86]. La fosforilación cambia las propiedades electrostáticas de las proteínas al agregar un grupo cargado negativamente, haciéndolas más hidrofílicas. La proteína tau contiene una alta proporción de residuos de serina y treonina, lo que la convierte en un sustrato atractivo para muchas quinasas específicas de serina/treonina [87]. Esto hace que la mayoría de las quinasas relacionadas con la fosforilación de tau formen parte de la familia de las proteínas quinasas de serina/treonina, que incluyen: la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), la GSK-3 $\beta$  (proteína diana de la señalización de insulina), la proteína quinasa activada por 5' AMP (AMPK), la proteína quinasa dependiente de ciclina tipo 5 (CDK5) o la proteína quinasa A (PKA) [88].



**Figura 7. El desarrollo de ovillos neurofibrilares de tau (NFTs).** La proteína tau se auto ensamblan para formar filamentos helicoidales emparejados (PHF) entrelazados de manera laxa y filamentos rectos fuertemente enrollados (SF), lo que conduce a la formación de NFTs. Fuente: Pharmaceuticals. Tauvid™. The first FDA-approved pet tracer for imaging tau pathology in Alzheimer's disease [89].

Estructuralmente, la tau es una proteína naturalmente desplegada, altamente soluble y con poca tendencia a la agregación. La disociación de la tau de los microtúbulos puede deberse a 1) la acetilación de las lisinas de la parte del dominio de unión a microtúbulos o 2) la hiperfosforilación de la proteína. El desequilibrio de quinasas/fosfatasa hacia una mayor actividad de quinasas de tau es lo que provoca la hiperfosforilación de tau, promoviendo así su completa disociación de los microtúbulos y la agregación de las especies de tau. Estas especies forman filamentos insolubles emparejados de 10 nm que se retuercen helicoidalmente entre sí, con una semiperiodicidad de aproximadamente 80 nm, llamados filamentos helicoidales emparejados (PHFs) [90]. Estos PHF terminan por agruparse y formar NFTs, los cuales poseen una alta capacidad citotóxica (**Figura 7**).

La presencia de estos NFTs se correlaciona con la alteración del transporte axonal y la disfunción de los orgánulos, lo que lleva a la apoptosis de las neuronas afectadas [91]. Por lo tanto, la tau hiperfosforilada y la presencia de NFTs serán responsables de activar los procesos más críticos en la neurona en un contexto patológico, cuyo estadio final es la degeneración por toxicidad neuronal: la activación de la caspasa-3 seguida de apoptosis neuronal [92,93] unida a la liberación de factores inflamatorios solubles de la glía, que generará un contexto neuroinflamatorio que extenderá el proceso degenerativo a su alrededor [91,94].

Uno de los factores que desencadenan la hiperfosforilación de la proteína tau es la presencia del péptido A $\beta$ . Este péptido estimula la actividad de la enzima GSK-3 $\beta$  [95] y provoca un aumento en los niveles de calcio dentro de las neuronas. Este aumento de calcio activa la calpaína y, como consecuencia, activa la quinasa CDK5. La CDK5 permanece activa y unida a p35, su proteína receptora unida a membrana que regula su actividad quinasa. El aumento de calcio induce también la escisión de p35 en un fragmento soluble, p25, a través de la calpaína. Este fragmento p25 queda asociado a CDK5, generando un estado hiperactivo de CDK5 permanente [96].

La tau hiperfosforilada puede liberarse a través de exocitosis y ser internalizada por otras células en forma de agregados neurofibrilares. Esto facilita la propagación de la hiperfosforilación de tau mediante un mecanismo de transmisión tipo priónico de célula a célula, afectando a las regiones cerebrales conectadas sinápticamente [97]. Este proceso de propagación de tau es específico y secuencial, comenzando en áreas como la corteza entorrinal, extendiéndose hacia el sistema límbico y el hipocampo, lo que resulta en un deterioro cognitivo leve. En estadios finales, aparece la invasión de la mayoría de la corteza cerebral [98].

#### 4.2.8. Neuroinflamación

Las placas de A $\beta$  y los NFTs son los principales marcadores neuropatológicos en la EA. Sin embargo, es cada vez más evidente que la neuroinflamación desempeña un papel significativo en la fisiopatología de la EA [99]. La neuroinflamación se refiere a la activación del sistema inmunológico en el cerebro, cuya función principal es proteger el sistema nervioso central contra daños, lesiones o infecciones [100]. Este proceso se caracteriza por la liberación de moléculas proinflamatorias como las interleuquinas (IL) 1 $\beta$ , 6, 18 y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), así como por la producción de quimioquinas como el CCL1, CCL5 y CXCL1, junto con mensajeros moleculares como las prostaglandinas y el óxido nítrico (NO), además de especies reactivas de oxígeno [101]. Las células principales implicadas en esta respuesta son las células de la glía. La glía es un tipo de célula del sistema nervioso que desempeña diversas funciones de soporte y protección para las neuronas. Hay varios tipos de células gliales, incluyendo la microglía (células del sistema mononuclear-fagocítico que penetran en el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario), los astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann [102]. Las principales involucradas en la respuesta neuroinflamatoria son la microglía y los astrocitos, aunque también pueden participar células endoteliales capilares e infiltraciones procedentes de la sangre, especialmente cuando la barrera hematoencefálica (BHE) sufre daño bioquímico o mecánico [103].

En la EA, la liberación de moléculas proinflamatorias en el sistema nervioso desempeña un papel crucial, desencadenando una cascada de efectos adversos [104]. Estas moléculas, que incluyen citocinas y quimiocinas proinflamatorias, pueden perturbar el funcionamiento normal de las sinapsis, los puntos de comunicación entre las neuronas. Esta disfunción sináptica puede resultar en la interrupción de la transmisión de señales nerviosas, lo que afecta negativamente la comunicación entre las células nerviosas y puede contribuir a la pérdida de la función cerebral [105]. Además, la presencia de moléculas proinflamatorias puede facilitar la muerte neuronal, un fenómeno conocido como neurodegeneración. La muerte de las neuronas puede conducir a la pérdida permanente de tejido cerebral y a la disminución de la función cognitiva y motora [106]. Otro efecto perjudicial de las moléculas proinflamatorias es la inhibición de la neurogénesis, el proceso mediante el cual se forman nuevas neuronas en el cerebro. La neurogénesis ocurre principalmente en regiones específicas del cerebro, como el hipocampo, que es crucial para la memoria y el aprendizaje [107]. La inhibición de este proceso puede tener consecuencias graves en la capacidad del cerebro para adaptarse y recuperarse de lesiones o enfermedades.

La neuroinflamación puede verse favorecida por la penetración de moléculas pro-inflamatorias, tóxicos y células desde la sangre, en especial cuando se altera la integridad de la BHE. La BHE es una estructura altamente especializada que separa la sangre del cerebro, garantizando un entorno interno estable y protegido para el sistema nervioso central. Esta barrera está compuesta principalmente por células endoteliales altamente selectivas que recubren los capilares sanguíneos cerebrales. Además, las células endoteliales están rodeadas por láminas de revestimiento que consisten en extensiones de los pies terminales de los astrocitos y pericitos, lo que añade una capa adicional de protección y regulación [108]. Un componente crucial de la BHE son las uniones estrechas (también conocidas como uniones oclusivas), que son estructuras especializadas que unen estrechamente las células endoteliales entre sí. Estas uniones estrechas actúan como barreras físicas, impidiendo el paso de moléculas y células no deseadas desde la sangre hacia el cerebro y viceversa [109]. La función principal de la BHE es regular el paso selectivo de moléculas y células entre la sangre y el cerebro, permitiendo la entrada de nutrientes esenciales mientras excluye toxinas, patógenos y otras sustancias dañinas. Esto es crucial para mantener un entorno cerebral óptimo para el funcionamiento neuronal adecuado. La integridad de la BHE es fundamental para la salud cerebral, y su alteración puede contribuir a una serie de trastornos neurológicos y enfermedades cerebrales [110].

Dos proteínas importantes que contribuyen a la formación y mantenimiento de estas uniones son la claudina-3 y la ocludina [111]. La claudina-3 es una proteína de membrana que ayuda a fortalecer las uniones estrechas al interactuar con otras proteínas dentro de las células endoteliales de los capilares cerebrales. Por otro lado, la ocludina es una proteína estructural clave que se encuentra en las uniones estrechas y juega un papel fundamental en la estabilidad y la permeabilidad de la BHE. Ambas proteínas colaboran para garantizar la integridad de las uniones estrechas, contribuyendo así a mantener un entorno cerebral adecuado y protegido. Alteraciones en la expresión o función de claudina-3 y ocludina pueden conducir a disfunciones en la BHE, lo que se ha asociado con diversas enfermedades neurológicas y trastornos cerebrales [110].

La evidencia científica creciente indica que tanto el péptido A $\beta$  como la disrupción de la BHE pueden promover mutuamente sus efectos en la EA. La glicoproteína-P, un transportador en la superficie luminal de la BHE, transporta eficientemente el A $\beta$  del cerebro al torrente sanguíneo. La disfunción de la BHE puede resultar en la acumulación de A $\beta$  al inducir una fuga de la BHE o una eliminación insuficiente [112]. La acumulación de A $\beta$  puede llevar a la disfunción de la BHE debido a la toxicidad endotelial y al aumento

de la adherencia de monocitos. Una causa de la disfunción de la BBB son las citoquinas inflamatorias, como el TNF- $\alpha$  y las interleuquinas IL1 $\beta$  y 17A, que pueden aflojar las uniones estrechas y comprometer la BHE [113]. En modelos animales de EA, la BHE se vuelve más permeable durante la inflamación periférica, lo que sugiere una mayor vulnerabilidad a la inflamación en estos modelos [114].

#### 4.2.8.1. *Mediadores celulares de la neuroinflamación*

Los astrocitos y la microglía son células gliales fundamentales en el SNC, y su activación juega un papel importante en diversos procesos neurodegenerativos. Cuando estas células gliales se activan, experimentan un cambio en su morfología y proliferan sus extensiones [115]. Tanto los astrocitos como la microglía tienen la capacidad de secretar una variedad de factores inflamatorios, que incluyen citocinas, prostanoïdes, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno y la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) [116]. Estos factores pueden contribuir a la inflamación en el cerebro y están estrechamente relacionados con la presencia de placas de amiloide y NFTs en la EA. Además, se ha observado que los pacientes con EA tienen niveles elevados de citocinas inflamatorias, lo que sugiere una activación significativa de la respuesta neuroinflamatoria en esta enfermedad [117]. La interacción entre los astrocitos, la microglía y la inflamación desempeña un papel crucial en el desarrollo y progresión de la EA [118].

#### 4.2.8.2. *Astroцитos*

Los astrocitos son células gliales especializadas que representan aproximadamente el 35% de la población total de células del SNC y se distribuyen por todas las regiones del mismo. Estas células presentan una variabilidad en su morfología. Los astrocitos desempeñan diversas funciones para mantener un entorno favorable para el funcionamiento neuronal [119]. Entre estas funciones se incluye la eliminación de desechos y toxinas del LCR, la regulación de neurotransmisores, la producción de factores de crecimiento y la regulación de las concentraciones de iones, así como el mantenimiento del equilibrio *redox*. Cualquier alteración en estas funciones debido a daños en los astrocitos durante reacciones fisiológicas puede desencadenar o empeorar la disfunción neuronal.

En respuesta a los oligómeros de A $\beta$ , los astrocitos se activan [94]. La activación de los astrocitos es un proceso en el que estas células gliales especializadas en SNC se vuelven más reactivas en respuesta a diferentes estímulos, como lesiones, infecciones, inflamación o cambios en el entorno neuronal. Durante la activación, los astrocitos experimentan cambios morfológicos y funcionales significativos, lo que les permite desempeñar un papel importante en la regulación y el mantenimiento del microambiente

neuronal. Este proceso está estrechamente vinculado con la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) derivado de la presencia de señales proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y los productos de la actividad de la enzima COX-2 en la corteza cerebral [120]. Algunos investigadores sugieren que los astrocitos podrían ser los conductores principales de la inflamación en la EA y apuntan a la senescencia de los astrocitos como un componente clave en la patogenia de esta enfermedad. Los factores proinflamatorios liberados por los astrocitos pueden aumentar la actividad de las secretasas, lo que promueve la conversión de la APP en A $\beta$  fibrilar, insoluble y neurotóxica en la membrana neuronal. Además, los astrocitos activados pueden expresar la enzima BACE1, responsable de la generación de A $\beta$ , lo que sugiere que podrían contribuir a la acumulación de A $\beta$  en modelos de ratones transgénicos con EA envejecida. También, se ha observado que los astrocitos activados en pacientes con EA esporádica muestran niveles elevados de presenilina-1, un componente catalítico del complejo  $\gamma$ -secretasa involucrado en la formación de A $\beta$  [94].

Si bien los astrocitos pueden representar una fuente importante de A $\beta$  durante la neuroinflamación en la EA, también se sabe que desempeñan un papel en la eliminación y degradación de A $\beta$ , proporcionando apoyo trófico a las neuronas y formando una barrera protectora entre las neuronas y los depósitos de A $\beta$  [121]. Los astrocitos reactivos pueden expresar enzimas que degradan A $\beta$ , como metaloproteinasas de matriz y neprilisina. Además, A $\beta$  puede aumentar los niveles de proteína APOE en los astrocitos, lo que se relaciona con respuestas antiinflamatorias y eliminación de A $\beta$ . Esto podría ser una respuesta neuroprotectora a la toxicidad inducida por A $\beta$ , sugiriendo un papel importante de la APOE en la protección neuronal contra el daño inducido por A $\beta$ . En resumen, los astrocitos, cuando se ven afectados por la inflamación crónica, pueden cambiar su comportamiento de una manera perjudicial, aumentando la producción de A $\beta$  y disminuyendo su capacidad para eliminar y degradar esta proteína por una disfunción del sistema glinfático.

#### 4.2.8.3. Microglía

El SNC cuenta con un grupo especializado de células inmunes innatas conocidas como microglía. Estas células son los macrófagos residentes, representando aproximadamente entre el 5% y el 10% de todas las células cerebrales en adultos [122]. La microglía tiene su origen en precursores mesenquimales del saco vitelino, que penetran en el cerebro y participan en su desarrollo pre y postnatal, especialmente en el podado sináptico (“*pruning*”) que ocurre en torno a la adolescencia. En la edad adulta, la microglía desempeña varias funciones clave, incluyendo la defensa del organismo contra invasores patógenos, la eliminación de desechos dañinos y la promoción de la

reparación de tejidos y el mantenimiento del equilibrio interno. Además, la microglía puede influir en la actividad de las células circundantes, como los astrocitos y las neuronas. En situaciones inflamatorias, se ha observado un aumento en la producción de microglía a partir de células madre en circulación, así como su activación [123]. Como principales reguladores de la respuesta inflamatoria en el SNC, la activación de la microglía puede resultar en la liberación rápida de moléculas inflamatorias, como quimioquinas, citoquinas y otros mediadores de inflamación y reparación.

La microglía puede no estar cumpliendo su función de frenar el avance de la EA debido a diversas razones. Una de ellas es que podrían estar abrumadas por la gran cantidad de A $\beta$  producido, lo que dificulta su capacidad para eliminarlo eficazmente. Además, a medida que la enfermedad progresa, la población de las células de microglía proinflamatorias (fenotipo M1) se incrementa, lo que contribuye a la neuroinflamación característica de la EA [124]. Un problema adicional es que, con el tiempo, la microglía pierde su capacidad para interactuar y eliminar los depósitos de A $\beta$ . Esto se debe a un declive relacionado con la edad en su capacidad para fagocitar estos agregados de proteínas anormales. Como resultado, la cantidad de A $\beta$  en el cerebro se acumula, lo que agrava la enfermedad.

La interacción entre la microglía y el A $\beta$  también desencadena la liberación de citoquinas inflamatorias y otras sustancias por parte de las células microgliales, lo que puede causar daño adicional a las neuronas. Además, ciertas enzimas, como BACE1 y las  $\gamma$ -secretasas, pueden contribuir al proceso al reducir la eliminación de A $\beta$  y aumentar su producción [125]. En resumen, aunque la microglía es importante para la defensa del cerebro contra las proteínas anormales como el A $\beta$ , su activación excesiva y los cambios asociados con la edad pueden contribuir al deterioro neuronal en lugar de prevenirlo.

#### 4.2.8.4. *Interferencia entre glía y neuronas*

Los estudios sobre neuroinflamación han revelado que la interacción entre la microglía, los astrocitos y las neuronas se da de forma coordinada para impulsar el proceso de neurodegeneración. Se ha observado que el péptido A $\beta$  activa la vía NF- $\kappa$ B en los astrocitos, lo que conduce a un aumento en la liberación de una proteína llamada complemento C3 [126]. Esta proteína, a su vez, afecta a receptores específicos C3a en las neuronas y la microglía, desencadenando disfunciones neuronales y activando aún más las microglías.

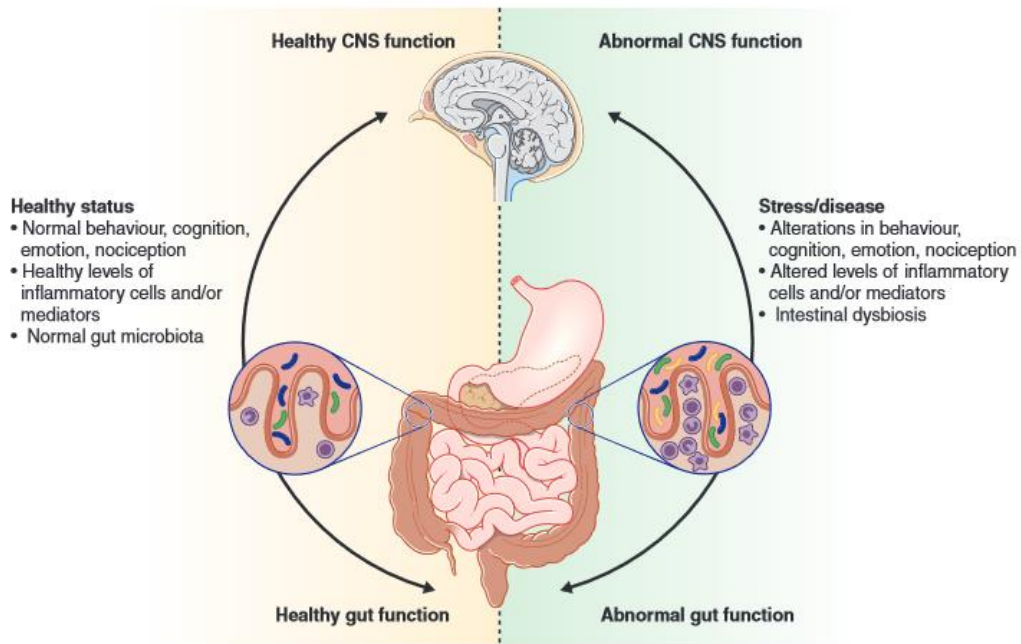
Por otro lado, se ha comprobado que la microglía activada puede inducir una forma de astrocitos específicos llamados A1, que pueden promover neurotoxicidad [118]. Este proceso ocurre mediante la liberación de ciertas moléculas inflamatorias como la IL-1 $\alpha$

y TNF $\alpha$ . Esta comunicación entre las células microgliales y los astrocitos puede crear un ciclo de retroalimentación positiva en un entorno inflamatorio característico de la EA. Esto podría desregular aún más la respuesta inflamatoria, llevando a un ciclo de inflamación amplificada en el cerebro afectado por la enfermedad.

#### 4.2.9. El Microbioma Intestinal y la enfermedad de Alzheimer

Un creciente conjunto de evidencias científicas apunta a que desequilibrios en el microbioma intestinal humano están vinculados a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer a través de procesos de neuroinflamación mediados por el eje microbioma-intestino-cerebro. El microbioma intestinal comprende una compleja comunidad de especies microbianas que residen en nuestro ecosistema gastrointestinal [127,128]. El microbioma intestinal influye en la salud cerebral mediante la liberación de toxinas y productos metabólicos bacterianos, como los ácidos grasos de cadena corta, lo que afecta la permeabilidad intestinal y diversas funciones inmunológicas. Estudios observacionales sugieren que los pacientes con EA muestran una menor diversidad en su microbioma, lo que podría contribuir a la progresión de la enfermedad [129,130].

Diversos estudios apuntan a que el microbiota intestinal humano modula la función cerebral y el comportamiento a través de una conexión bidireccional conocida como el eje microbiota-intestino-cerebro (E-MIC), que vincula vías neurales, inmunológicas, endocrinas y metabólicas. La investigación actual sugiere que las bacterias que residen en el microbioma intestinal tienen la capacidad de liberar sustancias proinflamatorias como LPS (activador de la inmunidad natural), lo cual puede activar células microgliales en el cerebro y contribuir a la producción de citoquinas proinflamatorias asociadas con el desarrollo de la EA [131]. La liberación de estas biomoléculas también compromete la integridad del E-MIC y la BHE, fenómeno que se agrava con la disbiosis creciente [132]. Se ha sugerido que la composición del microbioma intestinal humano y el riesgo de padecer EA son rasgos heredables. Recientemente, se ha demostrado que el gen APOE  $\epsilon$ 4, se correlaciona con la composición del microbioma en humanos y modelos de ratón de la EA [133–135]. Además, la activación de la vía PI3K, más adelante explicada y disfuncional por los oligómeros de A $\beta$  que la inhiben [136,137], también puede ser inducida por LPS, que son liberados por bacterias ubicadas principalmente en el intestino [138,139]. Las especies de LPS pueden atravesar tanto la barrera intestinal como la BHE, activando vías inmunes en el cerebro y desencadenando neuroinflamación a través de la activación de microglía y astrocitos reactivos [140,141].



**Figura 8. Impacto de la microbiota intestinal en el eje intestino-cerebro en la salud.** Una microbiota intestinal estable juega un papel fundamental en el mantenimiento de un funcionamiento normal del intestino y facilita una comunicación adecuada a lo largo de la conexión intestino-cerebro, promoviendo así el bienestar del individuo, como se ilustra en la parte izquierda de la figura. Sin embargo, como se observa en el lado derecho de la figura, un desequilibrio en la microbiota intestinal puede causar alteraciones en la fisiología intestinal, lo que conduce a una comunicación incorrecta a lo largo del eje intestino-cerebro y a efectos adversos en las funciones del sistema nervioso central (SNC), resultando en enfermedades. Por otro lado, el estrés a nivel del SNC puede impactar la función intestinal y causar cambios en la microbiota. Fuente: *United European Gastroenterology Journal. Hot topics in gut Microbiota* [142].

Las proteínas que componen las uniones estrechas están presentes tanto en el intestino, donde contribuyen a la formación de conexiones entre células epiteliales que revisten tanto el intestino delgado como el grueso [143]. Al igual que en la BHE, estas proteínas son fundamentales para regular la permeabilidad de la barrera intestinal y controlar el paso de moléculas y microorganismos desde el lumen intestinal hacia el torrente sanguíneo y viceversa. En el intestino, las uniones estrechas formadas por claudina-3 y ocludina ayudan a prevenir la filtración no deseada de toxinas y patógenos desde el intestino hacia la circulación sanguínea [144]. Además, estas proteínas contribuyen a mantener la homeostasis del intestino y a proteger contra la invasión de microorganismos patógenos y la inflamación. La disfunción de estas proteínas puede provocar un aumento de la permeabilidad intestinal, lo que se ha relacionado con trastornos gastrointestinales y enfermedades intestinales inflamatorias [145]. La relación entre intestino y cerebro se describe en la **Figura 8**.

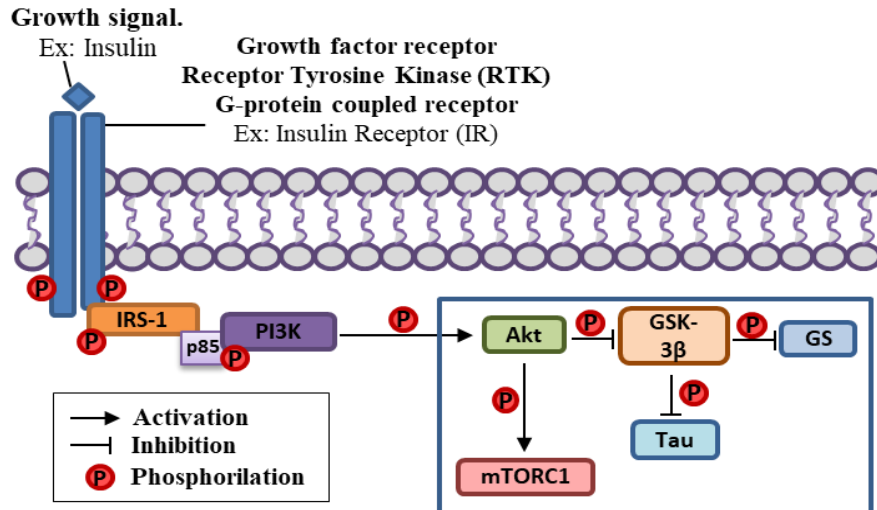
### 4.3. Resistencia cerebral a la insulina

#### 4.3.1. Diabetes mellitus tipo 2 y cascada de señalización de la insulina

La insulina es una hormona clave en la regulación de los niveles de glucosa en sangre, y su señalización es esencial en tejidos periféricos para controlar la absorción y utilización de la glucosa [146]. La insulina tiene dos efectos principales en el metabolismo: en primer lugar, la mitogénesis, que implica la inducción de la mitosis mediante un mitógeno; y, en segundo lugar, la estimulación del metabolismo anabólico, que consiste en la síntesis de moléculas orgánicas más complejas a partir de otras más simples, con un requisito de energía [147].

La insulina se libera por las células  $\beta$  en los islotes pancreáticos en respuesta a la absorción de alimentos y a los subsiguientes aumentos en los niveles de glucosa en sangre [148]. El mecanismo principal para la captación de glucosa dependiente de la insulina es la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) desde vesículas citosólicas hacia la membrana celular. La señalización de la insulina en la periferia generalmente ocurre en tejidos como músculos esqueléticos y tejido adiposo (adipocitos) [149].

La estructura de los receptores de insulina es importante para entender la señalización de ésta. Estos receptores son heterotetraméricos, compuestos por dos subunidades  $\alpha$  extracelulares y dos subunidades beta transmembranales con actividad de tirosina quinasa en su lado citosólico [150]. Cuando la insulina se une a los receptores de insulina en la periferia, se desencadena una cascada de eventos de señalización intracelular. La unión de la insulina provoca un cambio conformacional en los receptores, activando la actividad tirosina quinasa de las subunidades  $\beta$ . Esto lleva a la autofosforilación de los residuos de tirosina en las subunidades beta. Posteriormente, el receptor de insulina (IR) fosforila sustratos intracelulares, como el sustrato del receptor de insulina (IRS), en residuos de tirosina específicos. El IRS fosforilado actúa como un andamio para reclutar y activar otras moléculas de señalización, como la PI3K. La activación de PI3K desencadena una serie de eventos, incluida la activación de la vía de la quinasa Akt (**Figura 9**) [88,151]. Akt, a su vez, tiene múltiples efectos, incluida la translocación del transportador GLUT4 desde vesículas citosólicas a la membrana celular en células musculares y adiposas. La presencia de GLUT4 en la membrana celular facilita la captación de glucosa desde la sangre hacia el interior de las células, lo que ayuda a reducir los niveles de glucosa en la sangre [152].



**Figura 9. Diagrama esquemático de la señalización de la vía de la proteína quinasa B (Akt) a través del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1).** Factores de crecimiento fisiológicos, como la insulina, se unen a su receptor tipo quinasa de tirosina (RTK) en la membrana celular. Se forma un complejo receptor de insulina, lo que provoca un cambio conformacional en el propio receptor. Los dos dominios intracelulares se fosforilan mutuamente modificando su actividad quinasa y, por lo tanto, la afinidad de los dos dominios hacia otros sustratos. El adaptador IRS-1 se une ahora al receptor fosforilado. El dominio regulador p85 de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (p85-PI3K) se une a los dominios fosforilados de IRS-1, activando PI3K y llevando a la fosforilación de Akt. Luego, Akt inhibe por fosforilación a la glicógeno sintasa quinasa-3 beta (GSK-3β). Cuando está inactiva, la GSK-3β no puede fosforilar a sus sustratos para inhibirlos, lo que permite la activación de la enzima glicógeno sintasa (GS). Además, la inhibición de la quinasa GSK-3β contribuirá a la reducción de la fosforilación en la proteína tau, disminuyendo su hiperfosforilación y, por lo tanto, la agregación de tau. Akt también activa por fosforilación a la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) para aumentar la síntesis de proteínas. A su vez, mTOR inhibe la autofagia. Fuente: modificación de Figura 1 del artículo Dina Medina-Vera et al. [82] que se encuentra en el Apartado 7 de Resultados, 7.2).

La resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa resultan en una alteración de la homeostasis de la glucosa, un estado que describe la incapacidad para mantener niveles estables de glucosa, conocido con el término euglucemia. El mantenimiento de la euglucemia se controla a través de hormonas, como el cortisol y el glucagón, que aumentan las concentraciones de glucosa en sangre; la insulina, por otro lado, es la única hormona identificada que es capaz de reducir las concentraciones de glucosa de la sangre [153]. Por lo tanto, los niveles elevados de glucosa en sangre son un síntoma de resistencia a la insulina y de una condición crónica conocida como diabetes mellitus.

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) representa un trastorno metabólico que se distingue por la presencia de hiperglucemia, es decir, niveles elevados de azúcar en la sangre. Este fenómeno tiene su origen en la resistencia a la insulina manifestada en los tejidos

diana del organismo. La resistencia a la insulina implica una disminución en la capacidad de las células para responder eficientemente a la acción de la insulina, lo cual es fundamental para la regulación normal de los niveles de glucosa en la sangre. En el contexto de la DMT2, esta resistencia a la insulina provoca que las células del cuerpo dejen de reaccionar de manera adecuada a los estímulos de la insulina, lo que dificulta la entrada de glucosa en las células para su posterior utilización como fuente de energía. Además de la resistencia a la insulina, en algunos casos puede existir una falta relativa de secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  pancreáticas, que son responsables de la producción y liberación de esta hormona, generada por el agotamiento del páncreas endocrino tras el intento de superar la resistencia insulínica con una elevación de la secreción de esta hormona [154].

La combinación de la resistencia a la insulina y la posible insuficiencia en la secreción de insulina contribuye al aumento persistente de los niveles de glucosa en la sangre, dando lugar a la hiperglucemia característica de la DMT2. Es importante destacar que la hiperglucemia sostenida puede tener consecuencias negativas para la salud a largo plazo, afectando diversos órganos y sistemas del cuerpo. La DMT2 se considera una enfermedad crónica y, a menudo, está asociada con factores de riesgo como la obesidad, la falta de actividad física y la predisposición genética [155].

#### 4.3.2. Señalización de la insulina en cerebro

La señalización de la insulina en el cerebro desempeña un papel crucial en la regulación de varios procesos fisiológicos y metabólicos. Aunque la insulina es comúnmente asociada con la regulación del azúcar en la sangre, también actúa como una señal en el SNC. A pesar de que el control de la homeostasis de la glucosa periférica es una de las principales funciones de la insulina, su acción en el cerebro es crucial. Se considera al cerebro como un órgano sensible a la insulina debido a la presencia de receptores de insulina en él. Además, se han identificado vías de transducción de señales en ciertas regiones que median importantes efectos fisiológicos como: desarrollo neuronal, apetito, procesos cognitivos o regulación de la glucosa [156].

El cerebro tiene dos grupos de neuronas sensibles a la glucosa: las que se excitan por acción de la glucosa y las que se inhiben por ella, debido a la subida o bajada de la concentración de ésta, respectivamente [157]. Estas funciones de glucorregulación son controladas, en parte, por los transportadores de glucosa, encargados de la captación de glucosa. El transportador de glucosa más abundante en el cerebro es el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT-1). En neuronas del hipotálamo encontramos, además, el transportador de glucosa tipo 2 (GLUT-2) y tipo 8 (GLUT-8) [158]. El efecto de la insulina

en las neuronas sensibles a la glucosa puede explicarse debido a la apertura de los canales de adenosín trifosfato (ATP) sensibles a  $K^+$ , provocando una hiperpolarización celular que mejora la capacidad funcional para metabolizar la glucosa de estas células [159].

En el cerebro, los receptores de insulina (IR) se distribuyen ampliamente [160], con concentraciones más altas en neuronas y células gliales [161]. Según estudios inmunohistoquímicos, el IR se expresa en gran medida en el bulbo olfatorio, hipotálamo, corteza cerebral, amígdala e hipocampo [160]. La insulina se transporta a través de la BHE mediante un sistema de transporte saturable [156] y se piensa que está involucrada en el procesamiento de la memoria, según la expresión de IR en regiones cerebrales específicas, como el hipocampo y la corteza temporal medial [162].

El conocimiento de que la insulina puede pasar la BHE fue primero sugerido por Margolis y Altszuler [163] quién mostró que los niveles de insulina en el LCR de ratas incrementaban significativamente después de una inyección periférica de esta hormona, sugiriendo que la insulina cruza la BHE. La producción local de la insulina en el SNC ha sido también estudiada y hay evidencias experimentales al respecto [164]. Estos hallazgos han permitido a los autores concluir que, al menos una parte de la insulina cerebral es producto del propio cerebro. Hoy en día, mucha literatura respalda la idea del SNC, y en concreto el hipotálamo, como regulador de la ingesta, el peso corporal y la homeostasis de la glucosa. Por lo tanto, algunos de los defectos moleculares subyacentes a la DMT2 pueden residir en el SNC, lo que respalda el concepto de que la DMT2 es, al menos en parte, un trastorno hipotalámico.

Una investigación reciente [165] utiliza datos de transcriptómica de series temporales para estudiar la dinámica de las vías de respuesta a la insulina en el endotelio de la BHE. Los autores identifican múltiples vías activadas por la insulina, como la vía de la PI3K/Akt. Además, identifican nuevas vías y objetivos génicos que no se habían vinculado previamente a la señalización de la insulina en el endotelio de la BHE. También discuten las posibles implicaciones de estos hallazgos para enfermedades neurológicas y sugieren que dirigirse a vías específicas identificadas en este estudio podría ofrecer nuevos enfoques terapéuticos para tratar condiciones asociadas con disfunción de la BHE.

Un estudio adicional [166] se centra en la influencia de la resistencia a la insulina en el funcionamiento cerebral y su impacto en la capacidad de adaptación del hipocampo, una región esencial para el aprendizaje y la memoria. La investigación también investiga posibles indicadores biológicos de la resistencia a la insulina en el cerebro, como

cambios en los niveles de insulina en el LCR y la actividad metabólica de la glucosa en el cerebro. Los autores proponen que estos marcadores biológicos podrían ser valiosos para detectar a aquellos individuos en riesgo de deterioro cognitivo y para evaluar la efectividad de intervenciones diseñadas para mejorar la respuesta a la insulina en el cerebro. Estas afirmaciones se sustentan en observaciones derivadas de estudios farmacológicos y comportamentales que emplean estreptozotocina, una sustancia inductora de diabetes, demostrando que la administración de estreptozotocina conlleva a una significativa pérdida de memoria [167,168]. En el ámbito cerebral, tanto la insulina como la vía PI3K-Akt desempeñan un papel crucial en procesos como el metabolismo, el crecimiento neuronal y la formación de conexiones sinápticas. Además, se ha establecido una conexión entre la EA e irregularidades en la actividad de la insulina tanto en el cerebro como en tejidos periféricos.

#### 4.3.3. Conexiones entre la diabetes y enfermedad de Alzheimer

La DMT2 cada vez más se está viendo estrechamente relacionada con la EA, en la medida en que la EA es dos veces más frecuente en pacientes diabéticos. Algunos autores incluso han propuesto el término de 'diabetes tipo 3' para esta asociación. Varios estudios indican que la EA es una forma de diabetes específica del cerebro [169,170].

La conexión entre diabetes y EA fue identificada inicialmente por el estudio de Rotterdam, el cuál reveló que la diabetes incrementaba el riesgo de demencia [171,172]. Existen vínculos entre EA y DMT2 a través de alteraciones mitocondriales y promoción de estrés oxidativo, capacidad energética alterada y alteración del metabolismo de la glucosa, modificaciones en la utilización del colesterol, la formación de placas amiloides mediadas por el metabolismo alterado de A $\beta$  y, finalmente, hiperfosforilación y depósitos de agregados de tau [153]. Estudios clínicos y epidemiológicos han confirmado esta asociación y demostraron que los parámetros metabólicos alterados, como la hiperglucemia y la hiperinsulinemia, se correlacionaron positivamente con el desarrollo de patología relacionada con la EA en humanos [173]. Además, los cerebros con EA muestran una señalización defectuosa de la insulina, niveles alterados y/o la activación aberrante de los componentes de la vía de señalización de la insulina, todo ello resultando en una menor respuesta a la insulina [174].

Uno de los mecanismos asociados con la disfunción de la señalización de la insulina en el cerebro es la susceptibilidad para expresar el alelo APOE  $\epsilon$ 4. Se ha demostrado en modelos animales que el APOE  $\epsilon$ 4 interactúa con el receptor de insulina y promueve su retención en endosomas, evitando su transporte a la membrana celular y disminuyendo

la señalización de la insulina [175]. Estos estudios concuerdan con la hipometabolismo cerebral observado en pacientes que llevan el alelo APOE  $\epsilon 4$  [176]. Otro posible factor que contribuye a la disminución de la señalización de la insulina es la neuroinflamación sostenida en el cerebro de pacientes con la EA. Se ha demostrado que TNF- $\alpha$  inhibe la señalización de la insulina mediante la desregulación de IRS1 en células gliales del hipocampo [177].

Además de los efectos beneficiosos de la insulina en el cerebro, existe evidencia que sugiere que su señalización desempeña un papel directo en los mecanismos patológicos relacionados con A $\beta$  y tau. Estudios *in vitro* han demostrado que la insulina tiene la capacidad de frenar la unión de los oligómeros de A $\beta$  a las terminales axonales, reduciendo así el daño que pueden causar en las sinapsis neuronales [178]. Además, en un estudio realizado en perros Beagle (como modelo de EA), se observó que la señalización de la insulina, a través de la biliverdina reductasa A, impide la internalización de la  $\beta$ -secretasa en endosomas, lo que disminuye la vía amiloide en el procesamiento de la APP y la generación de A $\beta$  [179]. Por tanto, la regulación de la biliverdina reductasa A podría representar un nuevo objetivo terapéutico para prevenir o tratar esta enfermedad.

Diferentes estudios sugieren que la hiperinsulinemia modula los niveles extracelulares de A $\beta$  al afectar los mecanismos de eliminación. Tanto la insulina como el A $\beta$  son degradados por la enzima degradadora de insulina (IDE) [180]. Esto sugiere que los desequilibrios en el metabolismo de la glucosa y las disfunciones en la insulina pueden desempeñar un papel significativo en la patogénesis y progresión de las enfermedades neurodegenerativas.

IDE es una metaloproteasa crítica responsable de descomponer tanto la insulina como la proteína A $\beta$ . La competencia entre la insulina y la proteína A $\beta$  por los sitios de unión de IDE es fundamental en esta relación [181]. Cuando la función de IDE se ve comprometida, no solo afecta la degradación de la insulina, lo que conduce a la resistencia a la insulina, sino que también resulta en la acumulación de la proteína A $\beta$  en el cerebro. Esta acumulación, a su vez, contribuye a la formación de placas de amiloide. Por lo tanto, los defectos en IDE no solo afectan el desarrollo de la EA, sino que también establecen una conexión mecanicista entre el metabolismo de la insulina y los procesos moleculares subyacentes a la patología de la EA [8,182].

#### 4.3.4. Taupatía e insulina

La comunicación de la insulina también está vinculada repetidamente con la regulación de la actividad de la proteína tau. En efecto, la señalización de la insulina desempeña un papel crucial en la regulación negativa de la actividad de la enzima GSK-3 $\beta$ , la cual participa directamente en la fosforilación de tau (**Figura 9**). La resistencia a la insulina en el cerebro conduce a la alteración de la actividad de GSK-3 $\beta$ , fomentando la hiperfosforilación de tau [183]. Tau también interacciona con la proteína fosfatasa y homóloga a la tensina (PTEN), cuya función es desfosforilar el fosfatidilinositol-3,4,5-fosfato (PIP3), actuando como antagonista de la PI3K. La interacción de tau con la proteína homóloga a la tenosina impide la acción de esta última, permitiendo al receptor de insulina actuar sobre PI3K. En cambio, si se elimina tau, la proteína homóloga a la tenosina queda completamente libre para actuar sobre su sustrato PIP3, obstaculizando así la vía de la PI3K. Por lo tanto, tau es esencial para prevenir la resistencia a la insulina a través de la vía de la PI3K [184]. La hiperfosforilación de tau debido a la resistencia a la insulina también se ha vinculado con Akt y la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) [185]. En un modelo animal de sobreexpresión de tau, también se observó que la disminución de la señalización de la insulina está relacionada con la inhibición de la PP2A, una de las principales fosfatasas involucradas en la desfosforilación de tau [186].

Otras de las quinasas de tau altamente relacionada con la EA, es la CDK5. La desregulación de la CDK5 implica alteraciones en su actividad normal, que están vinculadas a procesos patológicos en el cerebro [187]. Normalmente, la CDK5 se activa mediante la unión a su subunidad reguladora p35 (también llamada receptor de CDK5). Sin embargo, en condiciones patológicas, la p35 puede ser escindida en una forma más pequeña llamada p25 mediante la acción de proteasas como la calpaína. A diferencia de la p35, la p25 forma un complejo más estable con CDK5. Esta estabilización prolongada de la activación de CDK5 por p25 conduce a una actividad persistente y desregulada de la enzima [188]. La presencia de p25 en lugar de p35 aumenta la actividad de CDK5 y su capacidad para fosforilar tau de manera más agresiva. Esto conduce a una hiperfosforilación excesiva de tau, promoviendo la formación de NFTs. El complejo p25/CDK5 tiene una mayor propensión a desencadenar eventos tóxicos en las neuronas, incluyendo la apoptosis o muerte celular programada [189]. Esto contribuye aún más a la pérdida neuronal observada en la EA. Además de su papel en la hiperfosforilación de tau, la activación desregulada de CDK5 también puede estar vinculada a la formación de placas de amiloide, otra característica patológica de la EA.

Uno de los factores que promueven la escisión de p35 a p25, es precisamente un aumento de calcio promovido por el péptido de Ab y la estimulación de la GSK-3 $\beta$  [95].

Por tanto, los progresos en la comprensión de las etapas preclínicas de la EA y la DMT2 pueden contribuir significativamente a la formulación de estrategias preventivas dirigidas a mitigar los efectos patogénicos de estos trastornos. En particular, se enfocarían en abordar la resistencia a la insulina en el cerebro, un factor que parece ser compartido por ambas enfermedades, y que ha servido para el impulso del desarrollo de esta tesis doctoral.

#### 4.4. Los inositoles

Los inositoles son compuestos orgánicos clasificados como alcoholes cíclicos similares al azúcar, debido a su estructura de seis carbonos y seis grupos alcohol. Los inositoles desempeñan un papel estructural y funcional en el cuerpo, ya que son componentes de fosfolípidos complejos en la membrana plasmática y actúan en las vías metabólicas como segundos mensajeros de la señalización de la insulina. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza como componentes celulares y se incorporan fácilmente a través de la dieta [4]. Dada su estructura, existen al menos ocho isómeros naturalmente presentes de inositoles (d-chiro-, l-chiro-, epi-, allo-, scyllo-, myo-, neo- y mucho-inositol) y un estereoisómero que no se da de forma natural, el cis-inositol (**Figura 10**). Además de su incorporación a través de la dieta, varios tejidos de mamíferos (principalmente riñones) también pueden sintetizar inositol de *novo* a partir de glucosa [190]. Existen moléculas derivadas del inositol y presentes en plantas, como el D-Pinitol (DPIN) que es la forma metilada en posición 3 del D-chiroinositol. Estos inositoles metilados retienen la actividad biológica de los inositoles.

Los inositoles forman parte de los fosfatidilinositoles (PI), una familia de fosfolípidos que constituye el 10-15% del total de lípidos de las células de mamíferos [191]. Los PI se encuentran principalmente en la membrana plasmática del retículo endoplásmico, donde se produce también la síntesis de los propios PI. Después de su síntesis, parte de los PI se canalizan hacia la cara luminal de la membrana plasmática para ser incorporados a estructuras de glicano formando los conocidos anclajes glicosilfosfatidilinositol (GPI) [192]. Los anclajes GPI son utilizados por muchas células para unir las proteínas de la superficie celular a la membrana plasmática. Éstos están formados por un grupo manosa (fosforilado), un azúcar (puede ser galactosamina o glucosamina) y, un grupo inositol. Los principales inositoles presentes en estos glicanos son myoinositol, D-*chiro*-inositol (DCI) y DPIN. Por tanto, los inositoles se encuentran tanto en el interior de la célula formando parte de la membrana del retículo

endoplasmático, como en la cara externa formando parte de los anclajes GPI de la membrana plasmática [193].

Los inositoles pueden ser además incorporados directamente en las células mediante un transporte facilitado por gradiente a través de cotransportadores de sodio *myo*-inositol (SMIT1 y SMIT2) [194]. Los cotransportadores de inositol exhiben afinidades distintas para los estereoisómeros, mostrando el DCI una mayor afinidad por SMIT2 que su derivado metilado, el DPIN, lo que favorece su captación celular [195]. Estos cotransportadores también presentan cierta afinidad por la glucosa, aunque menor a la que presenta por los inositoles [196]. Por otro lado, la insulina también afecta a la captación de inositoles, especialmente del DCI. La presencia de insulina aumenta el transporte del DCI a través de SMIT2 en células musculares [195]. Además de los cotransportadores SMIT1 Y SMIT2, los inositoles pueden ser incorporados a través del transportador acoplado a protones (HMIT) [197]. Esta incorporación dentro de la célula se produce en contra de gradiente y dependiente de una disminución del pH intracelular. La distribución de HMIT es mucho más reducida que la de los SMIT, encontrándose principalmente en regiones cerebrales debido a su localización en la mayoría de astrocitos y neuronas [198].

Los PI pueden ser fosforilados por quinasas específicas en diferentes posiciones del anillo inositol (concretamente la 3, 4 y 5) formando los denominados fosfoinosítidos (PIP). Los PIP, incluyendo especies como el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>) y otras formas fosforiladas, pueden actuar como segundos mensajeros en la señalización celular [199]. Los segundos mensajeros son moléculas pequeñas que transmiten señales intracelulares a partir de estímulos extracelulares, como la unión de un ligando a un receptor en la membrana celular. En el caso de los fosfoinosítidos, desempeñan un papel crucial en la transducción de señales, especialmente en la vía de la PI3K. La conversión de fosfatidilinositol-2-fosfato (PI2P) a PI3P en la parte interna de la membrana celular es mediada por PI3K. La generación de PIP<sub>3</sub> es crucial para reclutar la proteína quinasa dependiente de fosfatidilinositol 1 (PDK1) y Akt a la membrana [200]. Este es el paso limitante en la activación de Akt y, por lo tanto, en la transducción de señales por la vía canónica del receptor de insulina.

#### 4.4.1. Los inositoles en la vía no canónica de señalización del receptor de insulina

Las vías de insulina no canónicas se refieren a rutas de señalización celular que involucran la insulina, pero no siguen los patrones típicos o convencionales de la señalización de la insulina [201]. La vía de señalización de la insulina "canónica" generalmente implica la unión de la insulina a su receptor en la superficie de la célula,

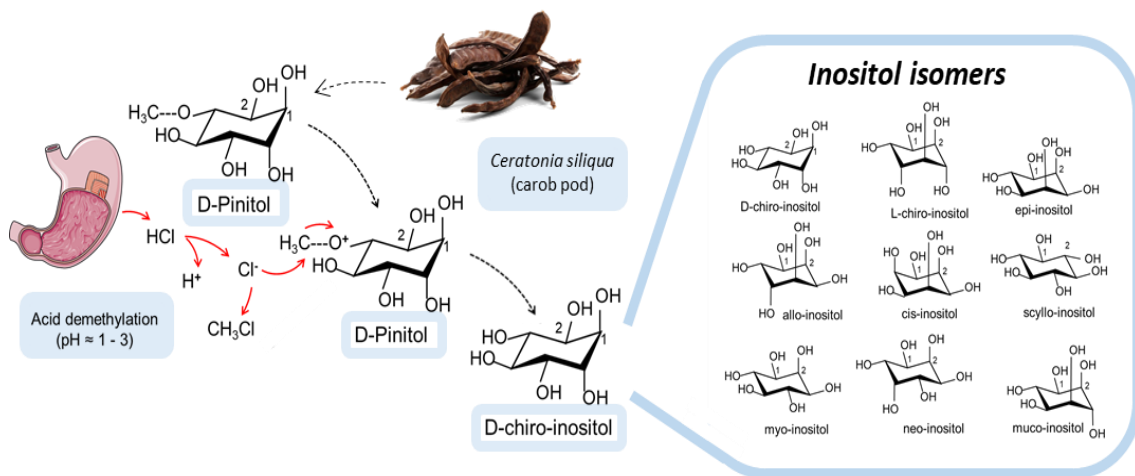
desencadenando una serie de eventos intracelulares que regulan el metabolismo de la glucosa [202], tal como se detalla en la **Figura 9**.

La principal vía no canónica de señalización de la insulina es la propuesta por Lerner J *et al.* 2010 [203] y que otros estudios avalan [204,205]. Resumidamente, la porción lipídica que ancla a los GPI a la membrana celular, puede ser escindida por enzimas lipasas como la fosfolipasa D (PLD) para formar productos tales como los inositoles fosfoglicanos (IPG). Esto es debido a que el receptor de insulina también se encuentra acoplado a una proteína G heteromérica (Gq), que activa a la PLD dando lugar a la producción de IPG solubles y a sus derivados, como es el compuesto INS-2 [206,207]. Estos IPG desempeñan algunas actividades similares a la insulina, entre las cuales destacan: la estimulación de la lipogénesis, el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno. Por tanto, los IPG y derivados pueden activar la ruta de señalización de la insulina extracelularmente por medio del receptor de insulina, pero, además, la célula los puede transportar hacia el interior a través de los mencionados anteriormente transportadores SMIT y HMIT. Una vez en el interior de la célula, los IPG (en concreto los IPG-P que contienen DPIN) pueden actuar como segundos mensajeros por diferentes vías que veremos en el siguiente apartado.

#### 4.4.2. El D-Pinitol como mediador insulínico

Inositoles como el *myo*-inositol, DPIN o DCI tienen una función osmótica en las plantas. El DPIN se encuentra en grandes cantidades en vegetales como trigo y en la pulpa del fruto del algarrobo (*Ceratonia siliqua*), del cual se puede aislar y producir a escala industrial [208]. El DPIN aislado se presenta como un sólido de color blanco con un peso molecular de 194,18 g/mol, y un punto de fusión de 186°C, siendo muy soluble en agua y ligeramente soluble en etanol [205,209]. El DPIN, la forma 3-O-methyl del DCI, es un principio activo de una planta tradicional antidiabética, *Bougainvillea spectabilis*, que ejerce efectos similares a la insulina [210]. La ruta de síntesis del DPIN es la siguiente: existe una conversión de D-glucosa-6-fosfato a L-*myo*-inositol-1-fosfato por ciclación. El L-*myo*-inositol-1-fosfato se defosforila a *myo*-inositol que luego se convierte, por epimerización del hidroxilo C3, a DCI. En el organismo humano, el DPIN experimenta un proceso de desmetilación en el tracto gastrointestinal debido a condiciones ácidas, dando lugar al DCI [207] (**Figura 10**). Cuando se administra por vía oral, tanto el DPIN como el DCI alcanzan su concentración máxima en el plasma después de un período de 4-5 horas. Es relevante señalar que, según investigaciones llevadas a cabo durante varios años en el ámbito farmacocinético y farmacodinámico, no se han informado efectos secundarios asociados con su uso [211,212]. Hasta la fecha se creía que era el

DCI el mediador insulínico. Sin embargo, los estudios realizados en el presente trabajo demuestran que el DPIN per se tiene un perfil farmacológico propio [1,213,214].



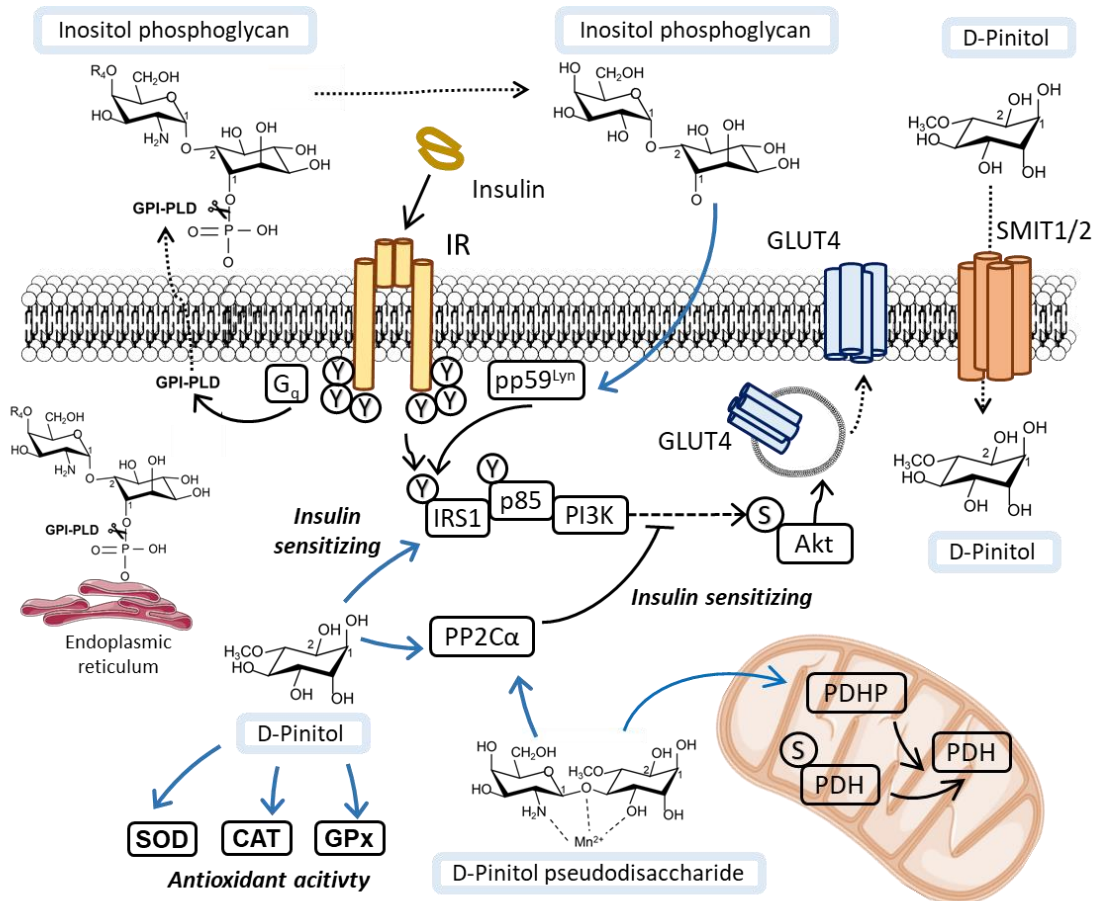
**Figura 10. Estructura química de D-Pinitol y D-chiro-inositol.** La estructura química del DPIN es C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>, y es un derivado del inositol que se encuentra comúnmente en ciertas plantas, como las leguminosas. Se encuentra en la pulpa del fruto del algarrobo (*Ceratonía siliqua*) en grandes concentraciones. Por otro lado, el DCI es un isómero del inositol y desempeña importantes funciones en diversos procesos biológicos. El DPIN experimenta un proceso de desmetilación en el tracto gastrointestinal por hidrólisis ácida, dando lugar al DCI, uno de los 9 isómeros diferentes de inositol. Fuente: modificación de Figura 1 del artículo Dina Medina-Vera et al. [88] que se encuentra en el Apartado 7 de Resultados, 7.3.

Entre los distintos inositóles, se ha evidenciado que el DPIN posee una actividad biológica, convirtiéndolos en una opción favorable para la suplementación alimentaria [204]. Además, DPIN tiene la capacidad de activar de manera autónoma la vía PI3K/Akt y desempeña un papel crucial en la acción de la insulina. El mecanismo de acción del DPIN en la señalización de insulina es el siguiente:

El DPIN se transporta hacia las células mediante los transportadores SMIT1/2, funcionando como segundo mensajero en la señalización de insulina. Puede actuar ya sea como una molécula única o como un pseudodisacárido de galactosamina-DPIN (INS-2). La liberación de DPIN también puede ocurrir directamente en el citoplasma, donde los GPI en el retículo plasmático facilitan la síntesis de los distintos IPG. En cualquiera de los dos casos, una vez dentro de la célula, el DPIN puede actuar como segundo mensajero de la vía de señalización de insulina por diversas vías (**Figura 11**):

- i) La incorporación de DPIN en los fosfolípidos de la membrana plasmática como la del retículo formando IPG, los convierte en sustratos para la actividad de PLD. La activación del receptor de insulina acoplado a Gq a través de una señalización no canónica estimula la fosfolipasa D de glicosilfosfatidilinositol (GPI-PLD), lo que resulta en la escisión y liberación de IPG y derivados (como el compuesto INS-2) unidos a la membrana. Esto conduce a la liberación de proteínas ancladas a la membrana y su redistribución desde microdominios de alta densidad de colesterol en la membrana hacia microdominios de baja densidad de colesterol, facilitando la actividad de la proteína quinasa pp59Lyn, previamente unida a caveolina, al reorganizar los microdominios de la membrana [215]. pp59Lyn a su vez media la fosforilación en tirosinas de IRS1, que sirve como reclutamiento de la subunidad reguladora de p85 de la PI3K. Esto llevaría a la activación por fosforilación de la Akt y finalmente la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática permitiendo así la captación de glucosa del torrente sanguíneo, lo que ayuda a reducir los niveles de azúcar en sangre [154].
- ii) Se ha observado que el INS-2, es un modulador alostérico de la fosfatasa PP2C $\alpha$  [203]. Esta fosfatasa desfosforila y activa a proteínas que controlan la actividad de PI3K [216], y de la GS [217], promoviendo la sensibilidad a la insulina y la síntesis de glucógeno a partir de glucosa.
- iii) En la mitocondria, INS-2 también tiene acción, pero esta vez activando la fosfatasa de piruvato deshidrogenasa (PDHP). La activación de la PDHP es un proceso que implica la desfosforilación de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), una enzima clave en la regulación del metabolismo oxidativo de la glucosa y la producción de energía en la célula [218,219].

Este modelo ofrece una perspectiva conceptual sobre cómo se desarrolla la vía no canónica, así como las funciones de DPIN como segundo mensajero en esta ruta, controlando proteínas involucradas en la vía canónica. En resumen, ambas vías trabajan en conjunto para facilitar la acción de la insulina de manera complementaria y cooperativa.



**Figura 11. Mecanismo propuesto de acción del D-Pinitol como segundo mensajero en la señalización de la insulina.** El D-Pinitol (DPIN) es transportado hacia las células a través de transportadores específicos SMIT1/2 y actúa como un segundo mensajero de la señalización de la insulina, ya sea como una molécula individual o como glicanos o pseudodisacáridos que contienen inositol. La activación por la insulina de la proteína Gq a través de una señalización no canónica estimula la GPI-PLD, mediando la liberación de inositol fosfoglicanos unidos a la membrana, los cuales median la activación de IR a través de la proteína pp59Lyn. El pseudodisacárido de DPIN modula la actividad de la proteína fosfatasa 2C (PP2C) y la fosfatasa de piruvato deshidrogenasa (PDHP). Además, el D-Pinitol tiene la capacidad de activar segundos mensajeros de la señalización de la insulina, PP2Cα y sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1), y también promueve la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), ejerciendo actividad antioxidante. Fuente: modificación de Figura 1 del artículo Dina Medina-Vera et al. [88] que se encuentra en el Apartado 7 de Resultados, 7.3.

De manera interesante, descubrimientos recientes han demostrado que PP2Cα es un mediador crucial en la señalización de insulina en las neuronas y funciona como una fosfatasa de tau, presentando así un posible blanco prometedor para el tratamiento de la EA [220,221]. Asimismo, se ha evidenciado que DPIN, por sí mismo, induce la activación de la PP2Cα y estimula la producción de enzimas antioxidantes [222]. En conjunto, estos hallazgos sugieren que DPIN puede tener efectos beneficiosos en el

control de la señalización celular y en la protección celular contra el estrés oxidativo, lo que podría ser relevante en contextos relacionados con la salud celular y la respuesta al estrés. Los mecanismos de señalización por DPIN podrían ofrecer la perspectiva de su aplicación terapéutica en condiciones asociadas a la acumulación de tau, como en la EA, parte importante que se ha desarrollado en esta tesis doctoral y será descrita en la discusión de resultados.

#### 4.4.3. El D-Pinitol contra la EA

El DPIN, un compuesto natural presente en algunas plantas y alimentos, ha surgido como un potencial agente terapéutico en la EA. Los estudios recientes han revelado propiedades neuroprotectoras y moduladoras del DPIN que podrían ser beneficiosas en el contexto de la EA [223]. En esta línea, surge la necesidad de explorar más a fondo el potencial terapéutico del DPIN y su mecanismo de acción en el tratamiento de esta devastadora enfermedad neurodegenerativa.

El DPIN ha sido objeto de estudio en relación con una variedad de funciones fisiológicas, como se documenta en investigaciones previas [4]. Uno de los hallazgos notables es su rápida absorción en el torrente sanguíneo después de una dosis oral, especialmente cuando se administra a individuos en ayunas. Esta rápida absorción se ve complementada por un proceso prolongado de absorción, lo que indica que el compuesto permanece en el cuerpo durante un período significativo de tiempo, lo que podría tener implicaciones importantes para su actividad biológica y sus efectos terapéuticos potenciales.

Otro aspecto importante es la interacción del DPIN con los carbohidratos. Se ha encontrado que la coadministración de DPIN con carbohidratos, como en forma de jarabe (que incluye glucosa, fructosa y DPIN), resulta en una reducción parcial en la absorción del compuesto. Este hallazgo sugiere que la presencia de carbohidratos puede modular la absorción y, por lo tanto, la eficacia del DPIN. Este descubrimiento también resalta la importancia del contexto en el que se administra el DPIN, sugiriendo que el ayuno puede ser un estado óptimo para maximizar sus efectos [224]. El descubrimiento de que el consumo oral del jarabe, que contiene DPIN, con carbohidratos resulta en niveles más bajos y estables de glucosa en sangre en comparación con la administración de glucosa sola es un hallazgo notable que sugiere posibles beneficios en el control glucémico [211]. Esto sugiere que el DPIN puede tener un papel en la regulación de la homeostasis glucémica y la sensibilidad a la insulina, lo cual es crucial en la prevención y el tratamiento de la resistencia a la insulina y la DMT2.

Además, en individuos sanos en ayunas, la administración exclusiva de DPIN ha demostrado ser capaz de reducir los niveles de insulina en sangre mientras mantiene estables los niveles de glucosa. Esto se logra mediante la coordinación de las acciones sobre la secreción de glucagón y grelina. Estas acciones sugieren un perfil farmacológico de DPIN que podría tener un efecto protector sobre el páncreas, al reducir la carga de secreción de insulina y, por lo tanto, disminuir uno de los principales factores que contribuyen a la resistencia a la insulina [224].

DPIN también ha demostrado actividad mejoradora en modelos preclínicos de EA, y en este sentido, se han llevado a cabo estudios de fase II que muestran una buena tolerabilidad y estabilización cognitiva (ClinicalTrials.gov: NCT00470418 y NCT01928420 [225,226]). El propósito de estos estudios fue evaluar la seguridad y eficacia de DPIN, también conocido como NIC5-15 en estos ensayos clínicos, en el tratamiento de la EA. El estudio fue diseñado utilizando 2 grupos experimentales: sujetos con EA e intervención con NIC5-15, y sujetos con EA e intervención con placebo. Los sujetos recibieron dosis crecientes de 1500, 3000 y 5000 mg diarios durante el curso del estudio.

Un hallazgo significativo demostró la capacidad de DPIN para interferir con la acumulación de A $\beta$  cultivos de neuronas del hipocampo. Se identificó que DPIN actuaba sobre la  $\gamma$ -secretasa, que como se ha comentado anteriormente es una enzima clave en la producción de A $\beta$ . Más precisamente, actuó como un modulador selectivo de la  $\gamma$ -secretasa, término utilizado para identificar aquellas moléculas que son selectivamente capaces de bloquear el APP sin interferir con otras vías de señalización. Concretamente, modulaba la  $\gamma$ -secretasa al reducir la producción de A $\beta$ , pero no afecta el clivaje del sustrato Notch- $\gamma$ -secretasa [178].

Se ha señalado que DPIN también puede actuar como un sensibilizador de los receptores de insulina [227]. Esto es significativo dado el creciente interés en la conexión entre la resistencia a la insulina y la patogénesis de la EA. Por lo tanto, el DPIN puede ser un agente apropiado para tratar la EA por muchas razones: modula la  $\gamma$ -secretasa, no afecta el sistema Notch, reduce la producción de A $\beta$  y es un sensibilizador para los receptores de insulina.

Sin embargo, en la EA, hay otro sello neuropatológico: la hiperfosforilación de la proteína tau. Investigadores muestran que la ausencia de una tau hiperfosforilada es capaz de prevenir la demencia en casos de EA familiar caracterizados por depósitos extensos de A $\beta$ , incluso cuando hay una considerable deposición de amiloide en cerebros *post*

*mortem*. Este fenómeno ha sido confirmado en estudios realizados en una línea específica de familias colombianas [40].

Actualmente, a pesar de los avances en la comprensión de la EA, sigue siendo un desafío encontrar tratamientos efectivos que aborden específicamente la fosforilación de tau y su agregación, procesos clave en la progresión de la enfermedad. Los investigadores han identificado quinasas, como GSK-3 $\beta$  y CDK5, que están involucradas en la fosforilación excesiva de tau, lo que conduce a la formación de NFTs y al deterioro cognitivo característico de la EA [228]. Se han desarrollado fármacos con el objetivo de inhibir estas quinasas y, por lo tanto, reducir la fosforilación anormal de tau. Sin embargo, los ensayos clínicos de fase II que evaluaron la eficacia de estos inhibidores no lograron demostrar mejoras significativas en la función cognitiva de los pacientes con EA. Concretamente, se han llevado a cabo dos ensayos de fase II dirigidos a GSK-3 $\beta$  o interfiriendo con la fosforilación de tau. Estos ensayos, que incluyeron un número significativo de participantes, no pudieron demostrar ningún efecto positivo sobre la progresión de la enfermedad o la mejora de las funciones cognitivas en los pacientes (ClinicalTrials.gov: NCT01049399 (146 sujetos) [229] y NCT01110720 (313 sujetos) [230]).

Como se ha mencionado en apartados anteriores, CDK5 es una quinasa pequeña necesaria para el correcto desarrollo del SNC de mamíferos y está involucrada en la fosforilación de la proteína tau. La asociación de CDK5 con p35, su subunidad reguladora, es fundamental para la activación de la quinasa. Sin embargo, en condiciones patológicas, como la EA, se produce una acumulación anormal del fragmento truncado de p35, conocido como p25, que se forma y se acumula en los cerebros de los pacientes con EA, conduce a la desregulación de CDK5 [189]. La escisión mediada por calpaína de p35 a p25 y la actividad aberrante resultante y la neurotoxicidad de CDK5 se han implicado en trastornos neurológicos, como la EA [188]. Las moléculas  $\mu$ -calpaína y m-calpaína son las principales formas de calpaína expresadas en las neuronas y se activan por concentraciones de Ca<sup>2+</sup> en el rango de  $\mu$ M y mM, respectivamente [231,232].

Se ha demostrado que CDK5 no solo está involucrada en la patogénesis de la EA, sino que también desempeña un papel en la regulación del metabolismo de la glucosa y la señalización de la insulina [233]. Estudios han sugerido que CDK5 puede contribuir al desarrollo de resistencia a la insulina en varios tejidos, incluyendo músculo esquelético, hígado y tejido adiposo. Sin embargo, los mecanismos exactos por los cuales CDK5 regula la sensibilidad a la insulina aún no se comprenden completamente. Algunos

estudios han sugerido que CDK5 puede afectar la señalización de la insulina al modular la actividad de efectores claves, como Akt y diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR). Además, se ha sugerido que CDK5 también puede influir en la función mitocondrial y el estrés oxidativo, ambos procesos que juegan un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina [234,235]. Por todo esto, el estudio del CDK5 y tau en relación a la EA será un punto clave de esta tesis doctoral y será descrito en la discusión de resultados.

#### 4.5. Estado actual terapia farmacológica de la enfermedad de Alzheimer: de la terapia sintomática a los modificadores del curso de la enfermedad

La complejidad de la EA desafía la existencia de una solución universal en forma de medicamento o intervención. No obstante, los avances científicos de los últimos años han proporcionado una comprensión más profunda de esta patología y han impulsado el desarrollo y la evaluación de nuevos tratamientos. Aunque aún no se ha hallado una cura definitiva, se están investigando fármacos que abordan las causas subyacentes de la enfermedad para frenar su progresión. Además, se han identificado medicamentos capaces de, temporalmente, mejorar o estabilizar los síntomas subjetivos de pérdida de la memoria y las funciones cognitivas en ciertos individuos en fases tempranas de la enfermedad, así como controlar síntomas y problemas conductuales asociados. Este panorama muestra la necesidad de desarrollar terapias más efectivas y opciones de manejo para quienes padecen esta enfermedad neurodegenerativa.

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA, por sus siglas en inglés) han dado su aprobación a diversos fármacos recetados destinados al tratamiento de la EA, con el fin de mitigar los síntomas y abordar la patología. Mayormente, estos medicamentos muestran su mayor eficacia en individuos en las primeras etapas o en la fase intermedia de la EA.

En el año 2023, el Instituto Nacional sobre el Envejecimiento (NIA) apoya actualmente 508 ensayos clínicos activos sobre la EA y demencias relacionadas (**Figura 12**) [236]. Cerca de la mitad de los ensayos (228) son tratamientos no farmacológicos enfocados en el cuidado y bienestar de los pacientes con demencia tipo Alzheimer. Por otro lado, solo 73 ensayos clínicos son de índole farmacológico, de los cuales solo 13 se encuentran en fase II/III. Las intervenciones farmacológicas más abundantes se centran en el péptido de A $\beta$  o la respuesta inflamatoria. Esto se debe a que, en los últimos años,

la mayoría de las estrategias farmacológicas dirigidas al tratamiento del Alzheimer se han centrado en la hipótesis de la cascada amiloide. Sin embargo, existe una discrepancia entre el inicio de los primeros signos de la patología amiloide y su posible relación con la declinación cognitiva progresiva en los pacientes con EA. Por consiguiente, se vuelve cada vez más imprescindible adoptar un nuevo enfoque o modelo centrado en la prevención o la detención del progreso de la enfermedad.



**Figura 12. Ensayos clínicos activos sobre la enfermedad de Alzheimer y demencias relacionadas.** En la categoría azul se incluyen tratamientos que implican el uso de medicamentos. En la categoría roja se agrupan intervenciones que no involucran el uso de medicamentos. Las intervenciones verdes se centran en el cuidado y la mejora del bienestar de los pacientes. Por último, las intervenciones violeta están dirigidas a la identificación de biomarcadores para diagnosticar y tratar síntomas neuropsiquiátricos. Fuente: National Institute on Aging. NIA-Funded Active Alzheimer's and Related Dementias Clinical Trials and Studies December 2023 [236].

Esto podría facilitar la exploración de nuevas opciones de tratamiento, fundamentadas en alternativas farmacológicas que puedan administrarse de manera segura muchos años antes de que aparezcan los posibles síntomas cognitivos.

#### 4.5.1. Medicamentos para la enfermedad de Alzheimer de leve a moderada

La galantamina, la rivastigmina y el donepezilo son medicamentos recetados como inhibidores de la colinesterasa para tratar los síntomas de la EA en sus fases iniciales a moderadas [237]. Estos fármacos están diseñados para ayudar a controlar ciertos síntomas cognitivos y conductuales asociados con la enfermedad. Estos inhibidores de la colinesterasa funcionan bloqueando la descomposición de la acetilcolina, un neurotransmisor crucial para la memoria y el pensamiento en el cerebro. Con el avance de la EA, la producción de acetilcolina disminuye, lo que eventualmente reduce la eficacia de estos medicamentos. Dado que estos inhibidores de la colinesterasa tienen un mecanismo de acción similar, cambiar de uno a otro puede no generar cambios notables en los resultados del tratamiento. Sin embargo, la respuesta individual a estos medicamentos puede variar, lo que significa que algunos pacientes pueden beneficiarse más de otros. La eficacia de estos tratamientos sintomáticos decae con la progresión de la neurodegeneración, por lo que sólo tienen una pequeña ventana temporal de efectividad.

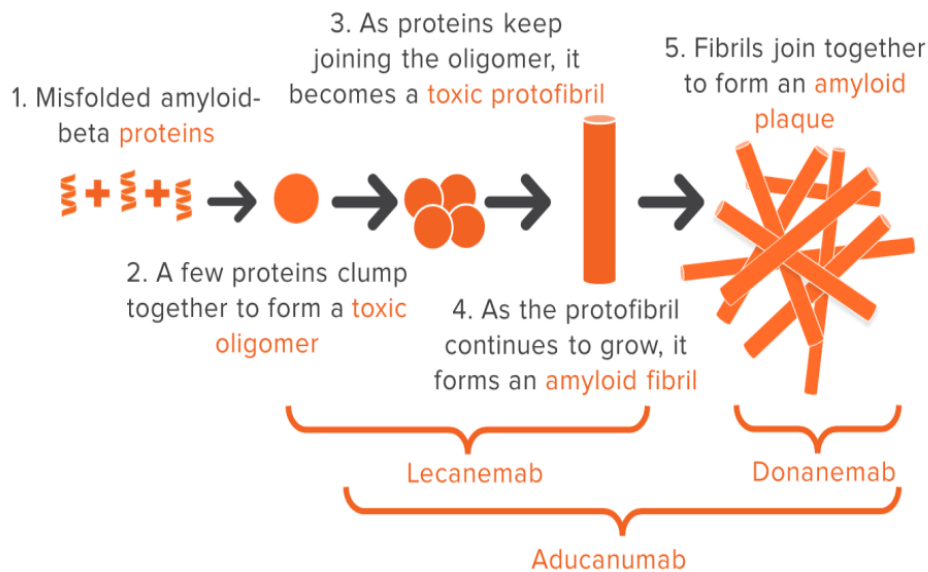
Debido al fallo de los ensayos clínicos desarrollados para intentar parar y revertir la enfermedad, se ha optado por la estrategia de modificar su curso enlenteciéndola. Estos modificadores del curso de la EA (*disease modifiers*) no tienen intención curativa sino de mejora de calidad de vida y de prolongación del periodo libre de síntomas. De entre este tipo de medicamentos, destacan las inmunoterapias contra la A $\beta$ . El *Lecanemab* es una inmunoterapia aprobada para tratar la EA en sus primeras etapas [238]. En concreto, lecanemab es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado que se dirige a las protofibrillas, una especie de A $\beta$  agregado soluble. El medicamento fue aprobado por la FDA para el tratamiento de la EA el 6 de enero de 2023. Esta aprobación se basó en los resultados de un ensayo clínico de fase II [239] y siguió a la publicación de los resultados de un ensayo de fase III en noviembre de 2022 [240]. El último estudio incluyó a 1795 pacientes con EA temprana. Los estudios clínicos sobre el lecanemab se han centrado en individuos con EA en sus primeras etapas o con deterioro cognitivo leve debido a esta enfermedad. Los resultados han demostrado una ralentización en la progresión del deterioro cognitivo durante un período de 18 meses, así como una reducción en los niveles de A $\beta$  cerebral [240].

Previo a la prescripción de lecanemab, los médicos pueden solicitar pruebas como tomografías por emisión de positrones (PET) o análisis de LCR para evaluar la presencia de depósitos de A $\beta$  en el cerebro. Es importante tener en cuenta que existen posibles efectos secundarios asociados con el uso de este medicamento, como la inflamación o el sangrado cerebral, que en casos raros pueden ser graves y representar un riesgo para la vida del paciente. Por lo tanto, se requiere un monitoreo regular a través de resonancias magnéticas. En una subcohorta de 698 pacientes, se detectó una reducción en la carga de amiloide por PET en el grupo de lecanemab pero no en el grupo de placebo.

Lecanemab es el segundo medicamento anti-A $\beta$  aprobado por la FDA, después de aducanumab [241]. Al igual que lecanemab, se demostró que aducanumab reduce la carga de amiloide en PET. Tanto lecanemab como aducanumab han mostrado reducir la cantidad de amiloide detectada en exámenes de PET. Sin embargo, cuando se trata de cómo afectan a los pacientes, los resultados son variados. Aunque se esperaba que aducanumab proporcionara beneficios clínicos, como una ralentización del deterioro cognitivo, esto solo se observó en uno de los dos estudios de fase III que se realizaron bajo condiciones muy similares. En resumen, aunque ambos medicamentos reducen la acumulación de A $\beta$  en el cerebro, solo uno de ellos ha demostrado tener un impacto claro en la función cognitiva en los pacientes con Alzheimer [241]. En junio de 2021, la FDA aprobó el aducanumab como fármaco para el tratamiento de la EA. Un estudio de fase IIIb/IV (ENVISION) está en curso para verificar el beneficio clínico de aducanumab en la EA temprana. A diferencia de aducanumab, la evidencia de eficacia de lecanemab ha sido consistente en todos los estudios y resultados [242]. El efecto beneficioso de lecanemab se ha asociado con su diana de unión. Específicamente, lecanemab se dirige principalmente a los protofibrilos de A $\beta$ , mientras que aducanumab se une a formas altamente agregadas de A $\beta$  [243].

Otra terapia alternativa anti-A $\beta$  en la EA temprana es el donanemab. Donanemab es otro anticuerpo monoclonal que se dirige a las placas A $\beta$ , y está diseñado para ayudar a eliminar estas placas y potencialmente ralentizar la progresión de la enfermedad [244]. En la fase II del estudio se encontraron asociaciones entre una mayor eliminación de placas en PET de amiloide y una progresión más lenta del PET de tau, así como un declive clínico más lento en portadores de *APOE*  $\epsilon 4$ . Actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase III para evaluar su seguridad y eficacia en pacientes con EA temprana. Los análisis preliminares han mostrado asociaciones prometedoras entre la eliminación de placas A $\beta$  mediante donanemab y una progresión más lenta de otros marcadores de la enfermedad, así como un declive cognitivo ralentizado en ciertos

subgrupos de pacientes. Sin embargo, su eficacia y seguridad aún se están evaluando en estudios clínicos en curso [245].



**Figura 13. Medicamentos de anticuerpos monoclonales para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.** Estos medicamentos funcionan uniéndose específicamente a ciertas proteínas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer, como el beta-amiloide ( $A\beta$ ) o la proteína tau, con el objetivo de reducir la acumulación de placas de amiloide en el cerebro o de modular la función de la proteína tau. Lecanemab se dirige al amiloide cuando comienza a formar fibras, mientras que donanemab se une al amiloide una vez que estas fibras se han agrupado para convertirse en una placa más grande en el cerebro. Un tercer fármaco, el aducanumab, apunta a ambos. Donanemab está actualmente en ensayos clínicos para evaluar su eficacia y seguridad en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Fuente: Alzheimer's Research UK: New Alzheimer's drug, donanemab – what is it and how does it work? [246].

Si bien los anticuerpos monoclonales como donanemab, lecanemab y aducanumab, que se dirigen al  $A\beta$  en el cerebro, pertenecen a la misma clase de tratamientos, ninguno de estos tratamientos es igual. Por consiguiente, funcionan de manera diferente al apuntar al  $A\beta$  en diferentes etapas de la formación de la placa amiloide, pero, en última instancia, estos tratamientos consiguen reducir el  $A\beta$  retardando la progresión de la enfermedad y reduciendo el deterioro clínico (**Figura 13**).

#### 4.5.2. Medicamentos para la enfermedad de Alzheimer de moderada a grave

La memantina es un medicamento utilizado para tratar los síntomas de la EA de moderada a grave. Pertenece a una clase de medicamentos conocidos como antagonistas de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). La memantina funciona regulando la actividad de ciertos neurotransmisores en el cerebro, como el glutamato, que están involucrados en los procesos de aprendizaje y memoria. El glutamato es una importante sustancia química cerebral. Cuando se produce en cantidades excesivas, el glutamato puede provocar la muerte de las células cerebrales. Por tanto, la memantina ayuda a mejorar la comunicación entre las células nerviosas y a protegerlas contra los efectos dañinos de la sobreestimulación por este glutamato. Este fármaco se prescribe con el objetivo de reducir los síntomas, lo que posiblemente otorgue a algunas personas la capacidad de mantener ciertas habilidades cotidianas durante un periodo prolongado en comparación con si no tomaran el medicamento. Por ejemplo, la memantina podría asistir a una persona en las etapas avanzadas de la enfermedad para conservar su autonomía en la utilización del baño por algunos meses adicionales. Esto se considera un beneficio significativo tanto para los individuos que padecen Alzheimer como para quienes los cuidan.

Otros medicamentos aprobados para tratar la EA de moderada a grave son el donepezilo, el parche de rivastigmina y un medicamento combinado de memantina y donepezilo. Ya comentados anteriormente, el donepezilo y la rivastigmina, son fármacos inhibidores de la colinesterasa. A diferencia del donepezilo que se toma en forma de pastillas, la rivastigmina también está disponible en forma de parche transdérmico. Este parche se coloca en la piel y libera gradualmente la medicación a través de la piel y hacia el torrente sanguíneo. Esto proporciona una liberación constante del medicamento durante un período de tiempo prolongado, lo que puede ayudar a mantener niveles estables del fármaco en el cuerpo. Es una opción conveniente para las personas que tienen dificultades para tragar pastillas o que tienen problemas gastrointestinales con los medicamentos orales.

Debido a que los antagonistas del NMDA funcionan de manera diferente a los inhibidores de la colinesterasa, se puede recetar los dos tipos de medicamentos en combinación. El medicamento combinado de memantina y donepezilo es un tratamiento que puede trabajar en diferentes vías biológicas para proporcionar un efecto terapéutico más completo. Este enfoque combinado a menudo se utiliza en personas que experimentan síntomas moderados a graves de la EA.

#### 4.5.3. Terapias dirigidas a la proteína tau

Los investigadores están enfocando sus esfuerzos en terapias dirigidas a la tau, ya que la proteína tau parece estar mejor correlacionada con la gravedad del deterioro cognitivo que el A $\beta$ . Actualmente, la mayoría de los agentes anti-tau en ensayos clínicos son inmunoterapias y se encuentran en las primeras etapas de investigación clínica. Cuatro anticuerpos monoclonales anti-tau (Gosuranemab, Tilavonemab, Semorinemab y Zagotenemab) y una vacuna anti-tau (AADvac1) han alcanzado la fase II hasta ahora [247]:

- Gosuranemab es un IgG4 humanizado que se dirige al extremo N-terminal de las isoformas extracelulares de la proteína tau [248]. El ensayo de fase II se detuvo al final debido a la falta de eficacia [249], lo que ha resultado en la terminación prematura de los ensayos clínicos de extensión abierta.
- Tilavonemab también es un IgG4 humanizado que se dirige a las isoformas agregadas solubles e insolubles extracelulares de tau en su porción N-terminal [250]. Los ensayos no lograron demostrar eficacia en la escala de evaluación de la demencia clínica, y el ensayo se ha detenido prematuramente.
- Semorinemab es un IgG4 humanizado que se dirige al extremo N-terminal de todas las isoformas de la proteína tau [251]. Se han llevado a cabo dos ensayos de fase 2 sin mostrar ningún efecto significativo en los criterios cognitivos. Actualmente no hay ensayos de fase 3 reportados en ClinicalTrials.gov. Casi tres cuartos de los pacientes en el ensayo de fase 2 eran portadores de *APOE  $\epsilon$ 4* [251].
- Zagotenemab es un IgG1 humanizado, derivado de MC-1, un anticuerpo específico de la conformación de tau dirigido contra la proteína tau Específico para los NFTs [252]. Zagotenemab se probó en fase 2 pero no mostró mejoría significativa.

Estudios en animales han sugerido que la eficacia terapéutica de la inmunoterapia de tau puede depender de la región de tau precisa que se está dirigida, con efectos conductuales que no se correlacionan directamente con la reducción de la carga patológica de tau.

A pesar de todo ello, los ensayos clínicos fallidos con anticuerpos monoclonales anti-tau en la EA han proporcionado información potencialmente importante para investigaciones futuras. Sin embargo, estos hallazgos sugieren que las inmunoterapias

anti-tau que reducen las especies de tau solubles en el cerebro durante las fases tempranas de la EA no producen beneficios clínicos significativos.

#### 4.5.4. El uso de nutraceúticos en España

Con toda esta descriptiva de terapias y fármacos contra la EA, es destacable mencionar por tanto que el enfoque en el diagnóstico, la detección temprana y el tratamiento de condiciones potencialmente reversibles adquieren una importancia crucial. A pesar del tratamiento de los síntomas gracias a los descritos inhibidores de la colinesterasa, esto solo ofrece una ventana temporal de unos años en la mejora de los síntomas cognitivos. Estos tratamientos se centran en aliviar los síntomas, pero no logran modificar el curso de la enfermedad. Por lo tanto, otra alternativa es la inmunoterapia, pero su altísimo costo y limitada accesibilidad plantean barreras significativas. En contraste, los productos naturales ofrecen una alternativa prometedora, ya que se dirigen a dianas terapéuticas conocidas, pudiendo comprobar su eficacia y son más asequibles económicamente. En la actualidad, hay 12 ensayos clínicos en marcha basados en intervenciones de la dieta o suplementación con agentes naturales (**Figura 12**). En España, intervenciones nutraceúticas como Neuralex o Souvenaid se utilizan en pacientes con quejas de memoria para enlentecer el envejecimiento [253]. Ambos tienen una composición que contiene una combinación de ácidos grasos Omega-3, vitamina D3 y vitaminas del grupo B. Esta composición presenta un desafío en su producción al ser mezclas magistrales, es decir, mezclas complejas y costosas. La solución planteada en la presente tesis doctoral es el uso de inosítoles del algarrobo, pudiéndose extraer, purificar y administrar de forma segura. Entre estos inosítoles presentes en el algarrobo, se ha seleccionado el DPIN debido a su historial como sensibilizador de insulina y su capacidad para mejorar el deterioro cognitivo en modelos de obesidad inducida por dieta asociada con neurodegeneración [254].

#### 4.6. Modelos animales de la enfermedad de Alzheimer

Comprender los mecanismos subyacentes de la EA y desarrollar estrategias terapéuticas efectivas requiere modelos experimentales que reproduzcan fielmente las características patológicas y clínicas de la enfermedad en humanos. En este sentido, los modelos animales han sido fundamentales para avanzar en la investigación de esta enfermedad neurodegenerativa.

Desde su descubrimiento, se han desarrollado diversos modelos animales que intentan recapitular las características clave de la EA, incluyendo la acumulación de placas de

A $\beta$ , la formación de NFTs, la neuroinflamación y la disfunción sináptica [255]. Entre los modelos más utilizados se encuentran los modelos transgénicos, que sobreexpresan genes asociados a la EA, como el gen de la *APP* y el de *MAPT*, generando así la acumulación patológica de estas proteínas [256].

Estos modelos han proporcionado importantes conocimientos sobre los mecanismos patogénicos de la EA y han servido como herramientas valiosas para probar nuevas terapias y drogas potenciales. Sin embargo, es importante tener en cuenta las limitaciones de estos modelos. Debido que la gran mayoría, hasta un 99%, de los casos de la EA se consideran de origen esporádico [257], son escasos los modelos animales mamíferos que reproducen de manera precisa los patrones biológicos asociados con esta enfermedad [258]. Esto se debe en parte a la complejidad de la enfermedad y a la falta de comprensión completa de sus mecanismos subyacentes. Entre las especies que se incluyen se hallan ovejas, cabras, chimpancés, perros y el degú patagónico (*Octodon degu*) [259–263].

En estudios con perros de la raza *Beagle*, se ha observado la presencia de características patológicas similares a las encontradas en humanos con EA, como la aparición gradual de placas de A $\beta$ , problemas en el funcionamiento de las mitocondrias y aumento del estrés oxidativo. Además, estos perros muestran signos clínicos de deterioro cognitivo asociado con la edad, lo que los convierte en un modelo relevante para estudiar los mecanismos subyacentes y probar nuevas terapias para la EA [263]. Una de las principales preocupaciones éticas y prácticas asociadas con el uso de perros *Beagle* y otros mamíferos superiores no primates en la investigación de la EA es el bienestar animal. Aunque los perros *Beagle* son animales comúnmente utilizados en la investigación debido a su tamaño moderado, comportamiento dócil y facilidad para entrenar, el uso de cualquier animal en experimentación plantea dilemas éticos sobre el sufrimiento potencial que pueden experimentar durante los procedimientos experimentales. Existen además preocupaciones relacionadas con los vínculos emocionales con los humanos y la necesidad de compañía.

Durante los últimos veinte años, se ha recurrido al desarrollo de modelos murinos como una alternativa para estudiar la EA esporádica. Estos modelos genéticamente modificados portan mutaciones que suelen estar vinculadas a la forma hereditaria de la enfermedad en genes como *APP*, *PSEN1* y *MAPT* [255]. El modelo murino ofrece varias ventajas importantes sobre otros modelos existentes:

1. **Reproducibilidad controlada:** Los modelos murinos permiten la manipulación genética y la introducción de mutaciones específicas relacionadas con la EA.
2. **Ciclo de vida corto:** Los ratones tienen un ciclo de vida relativamente corto en comparación con otros modelos animales, lo que permite estudiar el curso temporal de la enfermedad y evaluar el efecto de tratamientos a lo largo de un período más breve.
3. **Costo y mantenimiento:** Los ratones son más económicos de criar y mantener en comparación con otros modelos animales más grandes.
4. **Disponibilidad de herramientas genéticas:** Existe una amplia gama de herramientas genéticas disponibles para estudiar ratones, como líneas transgénicas, knock-out y knock-in, lo que permite una mayor versatilidad en el diseño experimental.
5. **Similitudes fisiológicas y genéticas:** A pesar de las diferencias en la complejidad del sistema nervioso central, los ratones comparten muchas similitudes fisiológicas y genéticas con los humanos, lo que facilita la extrapolación de los hallazgos a la enfermedad humana.
6. **Facilidad de manipulación experimental:** Los ratones son animales pequeños y fáciles de manipular en el laboratorio, lo que facilita la realización de experimentos y la administración de tratamientos.

En la actualidad, hay 221 modelos de ratón disponibles para estudiar la EA, según datos del sitio web alzforum.org [264]. La mayoría de estos modelos tienen al menos una mutación que provoca la sobreexpresión de uno de los tres genes mencionados anteriormente. El resto portan mutaciones en genes de riesgo como *APOE* o las  *$\beta$ -secretasas*. Estos modelos animales intentan imitar las anomalías patológicas asociadas con la EA. Sin embargo, no logran replicar completamente la acumulación de placas A $\beta$  ni de NFTs tanto a nivel biológico como en las características cognitivas observadas.

En la investigación llevada a cabo en esta tesis, se ha utilizado principalmente el modelo 5xFAD como modelo humanizado de depósito de A $\beta$ . Los ratones 5xFAD expresan transgenes humanos de APP y PSEN1 con un total de cinco mutaciones vinculadas a la EA, como son: sueca (K670N/M671L), Florida (I716V) y Londres (V717I) en *APP*, y las mutaciones M146L y L286V en *PSEN1*, que originan la EA familiar (FAD) [70]. Estos ratones ampliamente utilizados recapitulan muchos fenotipos relacionados con la EA que se detallan ampliamente en el siguiente punto.

#### 4.6.1. Neuropatología del modelo 5xFAD

El modelo 5xFAD desarrolla rápidamente una patología amiloide severa. Estos ratones acumulan altos niveles de A $\beta$ 42 intraneuronal, comenzando alrededor de los 1,5 meses de edad (**Figura 14.A**). La deposición amiloide extracelular comienza alrededor de los 2 meses, primero en el subículo y la capa V de la corteza, y aumenta rápidamente con la edad. Las placas se encuentran en todo el hipocampo y la corteza a los seis meses; en ratones más viejos, las placas están presentes en el tálamo, el tronco encefálico y el bulbo olfatorio, pero están ausentes del cerebelo [265]. Las hembras muestran una patología de placas más agresiva: el número de placas en el hipocampo y la corteza es mayor en las hembras que en los machos, y continúa aumentando hasta al menos los 14 meses de edad, mientras que en los machos se estabiliza a los 10 meses. Es por ello, que los estudios de esta tesis siempre se han realizado con una N balanceada de machos y hembras, para tener una representación fiel del conjunto.

La astrogliosis y la microgliosis comienzan alrededor de los dos meses, desarrollándose paralelamente con la deposición de placas. La degeneración sináptica comienza a los cuatro meses de edad [265]. Se ha observado la pérdida de neuronas en múltiples regiones cerebrales en este modelo. En las áreas con la amiloidosis más severa —el subículo y la capa cortical V— la pérdida de neuronas comienza aproximadamente a los 6 meses de edad [265]. También se ha observado una reducción en el número de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal a los 6 meses [266].

El sistema noradrenérgico también puede estar comprometido en este modelo: se han observado neuronas hipertrofiadas y astrogliosis en el locus coeruleus de ratones de 4.5 meses [267]. Se han reportado anomalías de la mielina en ratones aproximadamente a los 6 meses de edad [268]. Por último, los NFTs no son típicos en este modelo [265].

Además del modelo 5xFAD, en esta tesis doctoral se ha trabajado con otros dos modelos de ratón transgénico: el modelo 3xTg y el modelo APP NL-G-F:

El modelo 3xTg ha sido empleado principalmente debido a que presenta acumulación de NFTs como resultado de las tres mutaciones asociadas con la EA familiar (APP sueca, MAPT P301L y PSEN1 M146V) [269]. Por lo tanto, se trata de un modelo de tauopatía que hemos utilizado para compararlo con el 5xFAD después de la administración de DPIN. Los ratones 3xTg son viables, fértiles y no muestran anomalías físicas o de comportamiento evidentes inicialmente. La traducción de los

transgenes sobreexpresados está restringida al sistema nervioso central, incluyendo el hipocampo y la corteza cerebral. Estos ratones muestran tanto patología de placas como de NFTs. La deposición de A $\beta$  es progresiva, con inmunorreactividad intracelular detectada en algunas regiones del cerebro tan temprano como a los tres o cuatro meses de edad. Los depósitos extracelulares de A $\beta$  aparecen a los seis meses en la corteza frontal y se vuelven más extensos a los doce meses. Los cambios en la tau ocurren más tarde; a los 12 a 15 meses, se detectan agregados de tau con alteraciones conformacionales e hiperfosforiladas en el hipocampo [269,270]. Estos ratones desarrollan una neuropatología progresiva relacionada con la edad, incluyendo placas y NFTs. Los depósitos extracelulares de A $\beta$  son evidentes a los seis meses en la corteza frontal y se vuelven más extensos a los doce meses. Aunque la patología de la tau no se observa a los seis meses, es evidente a los doce meses. La disfunción sináptica, incluidos los déficits en la potenciación a largo plazo, ocurre antes que las placas y los NFTs (**Figura 14.B**). Por último, los ratones APP NL-G-F, fueron utilizados durante la estancia predoctoral realizada en el Instituto Karolinska de Estocolmo (Suecia). Al expresar APP a niveles normales mediante al utilizar un enfoque *knock-in* (el gen deseado se inserta en un *locus* específico en el genoma mediante recombinación homóloga), el modelo APP NL-G-F evita posibles sesgos causados por la sobreexpresión de APP y con mayor especificidad celular y temporal. Aunque APP no se encuentra sobreexpresado, los niveles de A $\beta$  patógeno están elevados debido a la combinación de tres mutaciones asociadas con la EA hereditaria. Específicamente, el diseño de APP, que incorpora una región de A $\beta$  humanizada, incluye las mutaciones sueca "NL", ibérica "F" y ártica "G". Estas mutaciones intensifican la toxicidad del A $\beta$  al incrementar la producción total de A $\beta$  (mutación sueca), aumentar la relación A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (mutación ibérica) y fomentar la agregación del A $\beta$  mediante la facilitación de la oligomerización y la reducción de la degradación proteolítica (mutación ártica) [271].

Los ratones APP NL-G-F acumulan A $\beta$  y reproducen varias patologías asociadas con la EA, como las placas amiloides, la pérdida sináptica y la microgliosis y astrocitosis, especialmente cerca de las placas. La incorporación de la mutación ártica acelera la patología y conlleva a fenotipos particularmente graves. La deposición de A $\beta$  se inicia a partir de los dos meses y está casi completada a los siete meses (**Figura 14.C**). Desarrollan amiloidosis subcortical además de la cortical, en línea con la neuropatología observada en pacientes con la mutación ártica. No se observan acumulación de NFTs ni neurodegeneración [271], aunque la tau fosforilada está elevada en las neuritas distroficas alrededor de las placas.

## Introducción



**Figura 14. Caracterización fenotípica de modelos de ratón para la enfermedad de Alzheimer.** A) Modelo 5xFAD, B) Modelo 3xTg y C) Modelo APP NL-G-F para la enfermedad de Alzheimer. Fuente: *Alzforum: Research Models Alzheimer's Disease* [264].

Los estudios realizados durante la estancia predoctoral han dado lugar a dos trabajos científicos publicados en revistas de alto impacto y un capítulo de libro. Estos trabajos no forman parte del compendio de artículos que avalan esta tesis, pero son de relevancia científica en la investigación de la EA (se encuentran recogidos en **Anexo I** y **Anexo II**). El primero de ellos estudia la disfunción sináptica que presenta el modelo animal APP NL-F y el modelo APP NL-G-F, y la traslación de estos resultados en muestras humanas. El segundo artículo y el capítulo de libro, describen del papel del sistema endocannabinoide (SEC) en la EA y la descripción de la desregulación del SEC en el modelo APP NL-G-F. Esta investigación de la relación del SEC y la EA viene precedida de un estudio previo a la estancia predoctoral, que describe la desregulación del SEC en el modelo murino 5xFAD (esta publicación se encuentra en **Anexo III**).

Con todo ello, se pone de manifiesto la intensa y multidisciplinar investigación que se ha llevado a cabo durante esta tesis doctoral en relación a la EA. A continuación, se detallan las hipótesis de trabajo y los objetivos enfocados en las publicaciones que avalan esta tesis doctoral en relación al DPIN y la EA.

## 5. Hipótesis y Objetivos

En el ámbito de la investigación neurocientífica, la comprensión de los mecanismos subyacentes a enfermedades neurodegenerativas como la EA ha sido objeto de un estudio continuo. Esta patología devastadora afecta no solo a la memoria y las funciones cognitivas, sino que también implica una interacción compleja entre factores metabólicos y neuropatológicos. En este contexto, la comprensión de los mecanismos subyacentes que contribuyen al desarrollo y progresión de esta enfermedad se ha vuelto imperativa. Una línea emergente de investigación sugiere que la resistencia a la insulina, tanto a nivel periférico como central, puede desempeñar un papel crucial en los procesos patológicos asociados con la EA, incluidos los relacionados con la cognición, la neuroinflamación y la neurodegeneración de la patología amiloide. Múltiples estudios han documentado la presencia de resistencia a la insulina en pacientes con esta enfermedad, lo que sugiere una conexión intrínseca entre el metabolismo de la glucosa y el desarrollo de la enfermedad.

La demencia asociada a la EA representa un desafío significativo que afecta a una proporción considerable de la población anciana. Dado su carácter crónico y su evolución prolongada, la planificación cuidadosa de la atención y las estrategias de intervención son de vital importancia. En los estadios iniciales de la enfermedad, el enfoque en el diagnóstico, la detección temprana y el tratamiento de condiciones potencialmente reversibles adquieren una importancia crucial. El patrón de actuación que se lleva a cabo cuando se diagnostica la enfermedad es el tratamiento de los síntomas gracias a inhibidores de la colinesterasa. Esto ofrece una ventana temporal de unos años en la mejora de los síntomas cognitivos y funcionales en las etapas tempranas a moderadas de la enfermedad. Sin embargo, estos tratamientos se centran en aliviar los síntomas, pero no logran modificar el curso de la enfermedad de manera significativa. Por lo tanto, surge la necesidad apremiante de encontrar enfoques terapéuticos que puedan ralentizar la progresión de la enfermedad para que la evolución sea más lenta y por tanto exista una ganancia en la calidad de vida de los pacientes. En otras palabras, surge la necesidad de encontrar un modificador de la enfermedad. La inmunoterapia ha surgido como una posible opción para modificar el curso de la EA, pero su alto costo y limitada accesibilidad plantean barreras significativas. En contraste, los productos naturales ofrecen una alternativa prometedora, ya que se dirigen a dianas terapéuticas conocidas, pudiendo comprobar su eficacia y son más asequibles económicamente.

En España, intervenciones nutraceúticas como Neuralex o Souvenaid se utilizan en pacientes con quejas de memoria para enlentecer el envejecimiento, pero presentan el desafío de ser mezclas magistrales, es decir, mezclas complejas y costosas. La posible solución que nosotros planteamos es el caso de los inositoles del algarrobo, pudiéndose extraer, purificar y administrar de forma segura. Entre estos inositoles presentes en el algarrobo, se ha seleccionado el DPIN debido a su historial como sensibilizador de insulina y su capacidad para mejorar el deterioro cognitivo en modelos de obesidad inducida por dieta asociada con neurodegeneración.

**Hipótesis general:**

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad asociada a resistencia a insulina que puede estudiarse en modelos humanizados murinos como el 5xFAD. Sobre este modelo podríamos desarrollar una terapia efectiva y asequible que pueda modificar el curso de la enfermedad. Para ellos hemos orientado la investigación a comprender el impacto del inositol D-Pinitol en la enfermedad de Alzheimer, por sus antecedentes como sensibilizador de insulina y de mejora de deterioro cognitivo, y su potencial como nutraceútico para la mejora de la calidad de vida de los pacientes afectados.

**Hipótesis específicas:**

**H1:** Productos naturales, como el D-Pinitol, son capaces de modular la resistencia a la insulina y otros aspectos patológicos asociados a neurodegeneración en modelos animales. Esto les posicionaría como candidatos prometedores para el tratamiento de trastornos vinculados a la resistencia insulínica cerebral (investigación del producto).

**H2:** Planteamos la enfermedad de Alzheimer como una enfermedad asociada a resistencia a insulina que puede estudiarse en modelos humanizados murinos. En este sentido, el modelo murino 5xFAD, que presenta depósitos de amiloide, neurodegeneración y resistencia a la insulina, se presenta como una herramienta valiosa para el estudio del D-Pinitol como sensibilizador a la insulina en el cerebro y como modificador del curso de la enfermedad de Alzheimer (investigación del modelo).

**H3:** Se postula que la disrupción en la señalización de la insulina desencadena cascadas patológicas que promueven la acumulación de placas amiloides, la hiperfosforilación de tau y la activación de procesos inflamatorios, contribuyendo así al deterioro cognitivo observado en los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Debido a

la estrecha relación entre la ruta de señalización de insulina y tau, se postula que el compuesto D-Pinitol influya en el estado de fosforilación de la proteína tau.

**H4:** El efecto del tratamiento con D-Pinitol en el modelo de ratón de Alzheimer 5xFAD brindará una alternativa terapéutica que abrirá nuevos horizontes en la investigación de la enfermedad de Alzheimer (investigación de la aplicabilidad del producto sobre el modelo).

El abordaje de estas hipótesis específicas requerirá una evaluación integral de los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a la interacción entre la resistencia a la insulina y la patología amiloide e hiperfosforilación de tau en el cerebro. Se anticipa que los hallazgos derivados de esta investigación no solo mejorarán nuestra comprensión de los procesos patológicos involucrados en la enfermedad de Alzheimer, sino que también podrían proporcionar nuevas perspectivas terapéuticas dirigidas a mitigar los efectos perjudiciales de la resistencia a la insulina en el cerebro en el contexto de esta enfermedad neurodegenerativa.

En base a la hipótesis enunciada se plantean cinco objetivos generales, cada uno con sus objetivos específicos correspondientes:

**Objetivo 1:** Investigación del producto D-Pinitol: descripción del mecanismo de acción del D-Pinitol y su potencial terapéutico en la señalización de la insulina y los sensores metabólicos del hipotálamo.

**Objetivos específicos:**

**1.1.** Investigación del impacto agudo del inositol Caromax®-D-Pinitol con el objetivo de examinar su capacidad para modular la vía de señalización de la insulina: exploración de la vía de señalización de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/Akt en el hipotálamo después de una administración oral aguda de D-Pinitol en ratas Wistar, analizando las formas fosforiladas y totales de las proteínas de la cascada de señalización.

**1.2.** Evaluación de la concentración de D-Pinitol, glucosa y hormonas periféricas en plasma.

**1.3.** Análisis de los sensores metabólicos mTOR y la proteína quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) en el hipotálamo y su posible regulación por DPIN después de la administración.

**Objetivo 2:** Descripción de la eficacia del D-Pinitol frente a la desfosforilación de la proteína tau. Examen del impacto farmacológico del DPIN en la señalización de la insulina y la fosforilación de tau, centrándonos ahora en el hipocampo de ratas Wistar y Zucker (modelo de obesidad inducido).

**Objetivos específicos:**

**2.1.** Medición de las concentraciones plasmáticas de DPIN en ratas Wistar y Zucker para conocer los niveles activos en plasma de DPIN después de una administración oral repetida del compuesto.

**2.2.** Evaluar del impacto de la administración oral crónica de DPIN en la señalización dependiente de PI3K/Akt y el estado de fosforilación de la proteína tau y sus principales quinasas, en el hipocampo de ratas Wistar y Zucker.

**2.3.** Examinar el estado de fosforilación de tau después de la administración de DPIN en un modelo animal de tauopatía establecido (3xTg).

**Objetivo 3:** Descripción del modelo murino humanizado de ratones 5xFAD.

**Objetivos específicos:**

**3.1.** Obtención de una colonia de ratones transgénicos 5xFAD heterocigotos (HTZ) y homocigotos (HZ) en dos grupos de edad distintos para representar el inicio temprano y tardío de la enfermedad, considerando ambos sexos.

**3.2.** Exploración de diversos factores que influyen en la neuropatología, abarcando desde la carga genética y el fenotipo conductual: realización de batería de procedimientos neurológicos para evaluar los reflejos somatosensoriales y sensoriomotores, la anhedonia, el estado emocional, el comportamiento de tipo ansiedad, y el aprendizaje y memoria de trabajo espacial de ratones HTZ y HZ a las diferentes edades.

**3.3.** Evaluación de la carga genética respecto al patrón de deposición de A $\beta$  en ratones HTZ y HZ, cuantificando A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 y el A $\beta$  total en las regiones del giro dentado (DG), CA1 y CA3 del hipocampo.

**3.4.** Análisis de los niveles plasmáticos de péptidos involucrados en la liberación de insulina y la cascada de señalización de la PI3K/Akt para evaluar las vías metabólicas vinculadas a la insulina.

**3.5.** Análisis de la composición taxonómica de la microbiota intestinal y la alteración de la integridad del revestimiento epitelial del intestino delgado según genotipo y edad.

**3.6.** Estudio de componentes principales (PCA) para investigar cómo se relacionan las diferencias cognitivas (del objetivo 2.2) y las alteraciones fisiopatológicas (de los objetivos 2.3, 2.4 y 2.5) observadas en el modelo animal transgénico 5xFAD a los 5 y 12 meses de edad.

**Objetivo 4:** Descripción bibliográfica de la conexión entre la hiperfosforilación de tau y la resistencia a la insulina

**Objetivos específicos:**

**4.1.** Explorar las interconexiones entre las tauopatías, la resistencia a la insulina cerebral y los inositoles para identificar nuevos modificadores potenciales para la enfermedad de Alzheimer.

**Objetivo 5:** Análisis del impacto terapéutico y la aplicabilidad del D-Pinitol como modificador multifacético de la enfermedad de Alzheimer en el modelo de ratón 5xFAD a edad temprana.

**Objetivos específicos:**

**5.1.** Evaluación del comportamiento anhedónico y emocional, el aprendizaje y la memoria de los ratones 5xFAD tratados con D-Pinitol.

**5.2.** Análisis de los niveles plasmáticos de péptidos y hormonas involucrados en la modulación de la liberación de la insulina, y la señalización y la cascada de señalización de la PI3K/Akt.

**5.3.** Examen marcadores proteicos clave de la enfermedad de Alzheimer: proteína tau, proteína A $\beta$  y la enzima degradadora de insulina (IDE, una de las principales proteasas que degrada A $\beta$  en el cerebro).

**5.4.** Efectos del tratamiento con D-Pinitol en la función de barrera intestinal y la respuesta inmune en el intestino delgado de ratones 5xFAD: análisis de la expresión de claudina-3 y ocludina, así como la expresión de TLR4 en el intestino y los lipopolisacáridos (LPS) en plasma.

**5.5.** Análisis de la composición taxonómica de la microbiota intestinal después del tratamiento con D-Pinitol.

## 6. Metodología

La metodología empleada en este trabajo de Tesis Doctoral se encuentra recogida en los artículos científicos publicados disponibles en el siguiente apartado de Resultados.

## 7. Resultados

### 7.1. Primera publicación. 'Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway in Rat Hypothalamus Induced by an Acute Oral Administration of D-Pinitol', 2021

En la actualidad, la compleja relación entre la insulina, el metabolismo de la glucosa y las moléculas relacionadas con el inositol se comprende de manera deficiente. El primer trabajo tuvo como objetivo abordar esta red complicada mediante el estudio de los efectos farmacológicos de la administración de DPIN sobre la activación de la vía de señalización de la insulina en el hipotálamo, un centro regulador metabólico sensible a esta hormona. Los resultados de este trabajo evaluaron no sólo los posibles efectos reguladores de DPIN en la vía de señalización de la insulina en el hipotálamo, sino también el estado funcional de los sensores metabólicos. Los estudios se realizaron en ratas Wistar después de la administración oral aguda del inositol natural DPIN, teniendo en cuenta como factor la dependencia temporal del compuesto. El estudio abordó inicialmente, el impacto de la administración oral de DPIN sobre sus concentraciones plasmáticas, así como las de glucosa y hormonas periféricas con papel metabólico como la insulina, el glucagón e IGF-1. Luego, se analizaron las formas fosforiladas y totales de las proteínas de señalización de PI3K/Akt. Por último, se consideraron los sensores metabólicos, mTOR y AMPK en el hipotálamo, así como su posible regulación por DPIN después de la administración. Los resultados indican que la administración aguda de DPIN indujo una fosforilación dependiente del tiempo de PI3K/Akt y de sus sustratos relacionados en el hipotálamo, sugiriendo una activación de la vía de señalización de la insulina. Más concretamente, DPIN desencadena la activación de Akt y, a su vez, de los sustratos de esta quinasa: GSK-3 $\beta$ , mTOR y GS. Este perfil de activación es consistente con DPIN actuando como un sensibilizador de la insulina, ya que también se observó una disminución en la concentración circulante de esta hormona. Las acciones farmacológicas de DPIN en el hipotálamo a través de la vía de la PI3K/Akt se observaron cuando se administró en animales en ayunas. Se sabe que la señalización de la insulina en el cerebro tiende a disminuir con el envejecimiento, y la resistencia a la insulina se ha identificado como uno de los principales factores de riesgo en las enfermedades neurodegenerativas. Esto sugiere que mejorar la sensibilidad a la insulina podría ser beneficioso para pacientes con trastornos asociados a la resistencia cerebral a la insulina, como la EA. Estos hallazgos respaldan la idea de que DPIN podría ser un candidato para tratar trastornos asociados a la resistencia cerebral a la insulina, al activar la respuesta a la insulina más allá del receptor de insulina.



## Article

# Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway in Rat Hypothalamus Induced by an Acute Oral Administration of D-Pinitol

Dina Medina-Vera <sup>1,2,3,4,†</sup> , Juan Antonio Navarro <sup>1,3,†</sup> , Rubén Tovar <sup>1,3</sup>, Cristina Rosell-Valle <sup>1</sup>, Alfonso Gutiérrez-Adan <sup>5</sup> , Juan Carlos Ledesma <sup>1</sup>, Carlos Sanjuan <sup>6</sup> , Francisco Javier Pavón <sup>1,4</sup> , Elena Baixeras <sup>7</sup>, Fernando Rodríguez de Fonseca <sup>1,\*</sup> and Juan Decara <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario Regional de Málaga, UGC Salud Mental, Avda. Carlos Haya 82, Pabellón de Gobierno, 29010 Málaga, Spain; dina.medina@ibima.eu (D.M.-V.); juan\_naga@hotmail.es (J.A.N.); rubentovar7@hotmail.com (R.T.); cristina.rosell@ibima.eu (C.R.-V.); juan.ledesma@uv.es (J.C.L.); javier.pavon@ibima.eu (F.J.P.)
- <sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain
- <sup>3</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain
- <sup>4</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), UGC del Corazón, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain
- <sup>5</sup> Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, 28040 Madrid, Spain; agutierr@inia.es
- <sup>6</sup> Euronutra S.L. Calle Johannes Kepler, 3, 29590 Málaga, Spain; euronutra@euronutra.eu
- <sup>7</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain; ebaixeras@uma.es
- \* Correspondence: fernando.rodriguez@ibima.eu (F.R.d.F.); juandecara@uma.es (J.D.); Tel.: +34-952-614-012 (F.R.d.F. & J.D.)
- † These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** D-Pinitol (DPIN) is a natural occurring inositol capable of activating the insulin pathway in peripheral tissues, whereas this has not been thoroughly studied in the central nervous system. The present study assessed the potential regulatory effects of DPIN on the hypothalamic insulin signaling pathway. To this end we investigated the Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Protein Kinase B (Akt) signaling cascade in a rat model following oral administration of DPIN. The PI3K/Akt-associated proteins were quantified by Western blot in terms of phosphorylation and total expression. Results indicate that the acute administration of DPIN induced time-dependent phosphorylation of PI3K/Akt and its related substrates within the hypothalamus, indicating an activation of the insulin signaling pathway. This profile is consistent with DPIN as an insulin sensitizer since we also found a decrease in the circulating concentration of this hormone. Overall, the present study shows the pharmacological action of DPIN in the hypothalamus through the PI3K/Akt pathway when giving in fasted animals. These findings suggest that DPIN might be a candidate to treat brain insulin-resistance associated disorders by activating insulin response beyond the insulin receptor.









**Keywords:** inositol; D-Pinitol; insulin resistance; hypothalamus; PI3K/Akt pathway

**Citation:** Medina-Vera, D.; Navarro, J.A.; Tovar, R.; Rosell-Valle, C.; Gutiérrez-Adan, A.; Ledesma, J.C.; Sanjuan, C.; Pavón, F.J.; Baixeras, E.; Rodríguez de Fonseca, F.; et al. Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway in Rat Hypothalamus Induced by an Acute Oral Administration of D-Pinitol. *Nutrients* **2021**, *13*, 2268. <https://doi.org/10.3390/nu13072268>

## 7.2. Segunda publicación. 'D-Pinitol promotes tau dephosphorylation through a cyclin-dependent kinase 5 regulation mechanism: A new potential approach for tauopathies?', 2022

Investigaciones recientes han establecido la existencia de una conexión entre la resistencia a la insulina en el cerebro y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, donde la presencia de un exceso de proteína tau hiperfosforilada contribuye al deterioro de las células neuronales. En este segundo estudio, se propuso como objetivo determinar si el inositol DPIN, reconocido por su capacidad como sensibilizador de la insulina, tenía algún impacto sobre el nivel de fosforilación de la proteína tau, que es regulada entre otras vías de señalización por la insulina. Para ello se examinaron, mediante la técnica de Western Blot, los efectos farmacológicos del DPIN sobre la cadena PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /tau en el hipocampo de ratas Wistar normoglicémicas y ratas Zucker diabéticas por déficit de señalización de leptina. Además, se exploró el estado funcional de quinasas adicionales que participan en la fosforilación de tau, como PKA, ERK1/2, AMPK y CDK5. Sorprendentemente, se descubrió que el tratamiento oral con DPIN redujo significativamente la fosforilación de tau, pero no mediante la esperada regulación de la quinasa GSK-3 $\beta$ . Tras una exhaustiva búsqueda de quinasas adicionales que influyen en la fosforilación de tau, se identificó que este efecto se llevaba a cabo a través de un mecanismo dependiente de la reducción de la actividad de la CDK5, fundamentalmente a través de las proteínas reguladoras p35 y p25, consideradas los receptores de CDK5 (CDK5R1). Este efecto no se observó en ratas Zucker deficientes en leptina, lo que revela que la combinación de la deficiencia de leptina, la obesidad, la dislipidemia e hiperinsulinemia anula las acciones del DPIN sobre la fosforilación de tau. Por último, se hizo uso del modelo de ratones 3xTg como grupo de control para tauopatías, ya que presenta mutaciones de tau que fomentan la fosforilación y la agregación de esta proteína. Los ratones 3xTg confirmaron la eficacia del DPIN en la reducción de la fosforilación de tau en este modelo humanizado de la EA. En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que el DPIN, al regular la actividad de CDK5 mediante la disminución de CDK5R1, podría desarrollarse como un fármaco prometedor para desarrollar tratamientos destinados a trastornos neurológicos como las tauopatías.

# D-Pinitol promotes tau dephosphorylation through a cyclin-dependent kinase 5 regulation mechanism: A new potential approach for tauopathies?

Dina Medina-Vera<sup>1,2,3,4</sup>  | Juan Antonio Navarro<sup>1,3</sup>  | Patricia Rivera<sup>1</sup>  |  
Cristina Rosell-Valle<sup>1</sup> | Alfonso Gutiérrez-Adán<sup>5</sup> | Carlos Sanjuan<sup>6</sup> |  
Antonio Jesús Lopez-Gambero<sup>1,2</sup>  | Rubén Tovar<sup>1,3</sup> | Juan Suárez<sup>1,7</sup>  |  
Francisco Javier Pavon<sup>1,4</sup>  | Elena Baixeras<sup>8</sup>  | Juan Decara<sup>1</sup> |  
Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, Hospital Universitario Regional de Málaga, UGC Salud Mental, Málaga, Spain

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

<sup>3</sup>Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

<sup>4</sup>Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA and CIBER Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Hospital Universitario Virgen de la Victoria, UGC del Corazon, Málaga, Spain

<sup>5</sup>Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain

<sup>6</sup>Euronutra S.L., Parque Tecnológico de Andalucía, Málaga, Spain

<sup>7</sup>Departamento de Anatomía Humana, Medicina Legal e Historia de la Ciencia, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

<sup>8</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

## Correspondence

Dina Medina-Vera, Juan Decara and Fernando Rodríguez de Fonseca, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), UGC Salud Mental, Hospital Universitario Regional de Málaga, Avenida Carlos Haya 82, 29010 Málaga, Spain.  
Email: [fernando.rodriguez@ibima.eu](mailto:fernando.rodriguez@ibima.eu);  
[dina.medina@ibima.eu](mailto:dina.medina@ibima.eu); [juandecara@uma.es](mailto:juandecara@uma.es)

**Background and Purpose:** Recent evidence links brain insulin resistance with neurodegenerative diseases, where hyperphosphorylated tau protein contributes to neuronal cell death. In the present study, we aimed to evaluate if D-pinitol inositol, which acts as an insulin sensitizer, affects the phosphorylation status of tau protein.

**Experimental Approach:** We studied the pharmacological effect of D-pinitol on insulin signalling and tau phosphorylation in the hippocampus of Wistar and Zucker rats. To this end, we evaluated by western blotting the Akt pathway and its downstream proteins as being one of the main insulin-mediator pathways. Also, we explored the functional status of additional kinases phosphorylating tau, including PKA, ERK1/2, AMPK and CDK5. We utilized the 3xTg mouse model as a control for tauopathy, since it carries tau mutations that promote phosphorylation and aggregation.

**Key Results:** Surprisingly, we discovered that oral D-pinitol treatment lowered tau phosphorylation significantly, but not through the expected kinase GSK-3 regulation. An

**Citation:** Medina-Vera, D., Navarro, J.A., Rivera, P., Rosell-Valle, C., Gutiérrez-Adán, A., Sanjuan, C., López-Gambero, A.J., Tovar, R., Suárez, J., Pavon, F.J. and Baixeras, E. d-Pinitol promotes tau dephosphorylation through a cyclin-dependent kinase 5 regulation mechanism: A new potential approach for tauopathies?. *British journal of pharmacology* 2022, 179(19), pp.4655-4672. Citation: Medina-Vera, D., Navarro, J.A., Rivera, P., Rosell-Valle, C., Gutiérrez-Adán, A., Sanjuan, C., López-Gambero, A.J., Tovar, R., Suárez, J., Pavon, F.J. and Baixeras, E. d-Pinitol promotes tau dephosphorylation through a cyclin-dependent kinase 5 regulation mechanism: A new potential approach for tauopathies?. *British journal of pharmacology* 2022, 179(19), pp.4655-4672. <https://doi.org/10.1111/bph.15907>

### 7.3. Tercera publicación. 'Novel insights into D-Pinitol based therapies: a link between tau hyperphosphorylation and insulin resistance', 2023

Una de las necesidades médicas no satisfechas más relevantes hasta la fecha es la disponibilidad de terapias efectivas y accesibles para la prevención de la demencia asociada con trastornos neurodegenerativos importantes, incluido el más frecuente, la EA. Los desarrollos farmacológicos actuales orientados hacia la reducción de los síntomas cognitivos (inhibidores de la colinesterasa) o la carga de amiloide A $\beta$  solo muestran una eficacia moderada, actuando como tratamientos sintomáticos o modificadores del curso de la enfermedad. Además, una de las principales causas que obstaculiza los exitosos desarrollos farmacéuticos es la falta de una hipótesis etiopatogénica consistente para la EA esporádica, que representa más del 95% de los casos. Se están desarrollando nuevas hipótesis metabólicas (por ejemplo, resistencia cerebral a la insulina, alteraciones metabólicas de los lípidos cerebrales o hiperfosforilación de la proteína tau) en un intento de identificar los objetivos clave relevantes para nuevos medicamentos capaces de modificar el curso de la enfermedad. Entre ellos, el descubrimiento de la necesidad de hiperfosforilación y depósito de tau (tauopatías) para el desarrollo de la demencia ha establecido la fosforilación de la proteína tau como un objetivo para modificadores del curso de estas enfermedades neurodegenerativas. Entre las múltiples causas de la hiperfosforilación de tau, la resistencia cerebral a la insulina ha generado mucha atención, y los inositoles como sensibilizadores de la insulina actualmente se están considerando como candidatos para el desarrollo de medicamentos. En este tercer trabajo, que trata de una revisión bibliográfica, se ha abordado la plausible interconexión entre los siguientes tres aspectos: tauopatías, resistencia cerebral a la insulina e inositoles, que eventualmente podrían ayudar a identificar objetivos para nuevos modificadores de enfermedades como la EA, capaces de brindar esperanza a los millones de personas afectadas por esta devastadora enfermedad. Con estos estudios realizados y la estrecha relación entre la insulina, la EA y la tau, se han propuesto los posibles mecanismos de acción del DPIN en la EA y se ha presentado un resumen de los objetivos de desarrollo farmacológico del DPIN en la EA. Como reflexión final, se discute la posibilidad de que los tratamientos futuros para la EA incluyan ajustes farmacológicos y dietéticos en la gestión de la insulina y la glucosa, como los inositoles, como complemento a las nuevas terapias en desarrollo.

# Novel insights into D-Pinitol based therapies: a link between tau hyperphosphorylation and insulin resistance

Dina Medina-Vera<sup>1,2,3,\*</sup>, Antonio Jesús López-Gamero<sup>1,2,4,\*</sup>, Juan Antonio Navarro<sup>1</sup>, Carlos Sanjuan<sup>5</sup>, Elena Baixeras<sup>6</sup>, Juan Decara<sup>1</sup>, Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>1,\*</sup>

## Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder characterized by the amyloid accumulation in the brains of patients with Alzheimer's disease. The pathogenesis of Alzheimer's disease is mainly mediated by the phosphorylation and aggregation of tau protein. Among the multiple causes of tau hyperphosphorylation, brain insulin resistance has generated much attention, and inositols as insulin sensitizers, are currently considered candidates for drug development. The present narrative review revises the interactions between these three elements: Alzheimer's disease-tau-inositols, which can eventually identify targets for new disease modifiers capable of bringing hope to the millions of people affected by this devastating disease.

**Key Words:** Alzheimer's disease; cyclin-dependent kinase 5; diabetes; D-Pinitol; inositols; insulin resistance; kinases; phosphorylation; PI3K/Akt; tau

**Citation:** Medina-Vera D, López-Gamero AJ, Navarro JA, Sanjuan C, Baixeras E, Decara J, de Fonseca FR. Novel insights into D-Pinitol based therapies: a link between tau hyperphosphorylation and insulin resistanc. *Neural Regen Res* 2024, 19(2):289-295. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.379015>

#### 7.4. Cuarta publicación. 'Transcending the amyloid-beta dominance paradigm in Alzheimer's disease: An exploration of behavioural, metabolic, and gut microbiota phenotypes in 5xFAD mice', 2023

La teoría de la cascada amiloide es ampliamente aceptada como una explicación de los cambios en el tejido cerebral observados en la EA. No obstante, se cuestiona si el péptido A $\beta$  es la única causa de estos cambios. Con la intención de investigar si la disminución cognitiva en la EA se encuentra únicamente asociada a la presencia de A $\beta$  en el cerebro o si otros elementos influyen en la evolución de la enfermedad, se ha realizado un cuarto estudio en el cual se ha llevado a cabo un análisis más detallado del modelo de ratón de la EA, el 5xFAD. Este modelo humanizado desarrolla una amiloidosis cerebral acelerada. En este trabajo se han explorado diversos factores que contribuyen a la neuropatología, incluyendo la carga genética (expresión del transgén en homocigosis (HZ) o heterocigosis (HTZ)), el comportamiento, marcadores de neuropatología, la fisiología metabólica, el estado de permeabilidad de la barrera intestinal y la composición del microbioma intestinal en etapas tempranas (5 meses de edad) y avanzadas (12 meses de edad) de la enfermedad, teniendo en cuenta, además, el factor sexo (machos vs hembras). Los resultados muestran que, en edad temprana, tanto los ratones HTZ como los HZ presentaron alteraciones en el hipocampo relacionadas con la acumulación de A $\beta$ , provocando un aumento en la neuroinflamación y la interrupción de la vía PI3K-Akt. No obstante, solo los ratones HZ exhibieron deterioro cognitivo en pruebas de comportamiento como el laberinto Y y el laberinto acuático de Morris, empeorando con la edad. Además, se observó una regulación alterada de la secreción de insulina y del péptido regulador GIP en ratones de 5 meses, desapareciendo más tarde con la edad. Los niveles circulantes de hormonas metabólicas reguladoras, como la grelina y la resistina, permitieron diferenciar entre los ratones HTZ y HZ. También, se evidenciaron diferencias en la composición del microbioma intestinal, la alteración de las proteínas de la barrera intestinal y el aumento de productos proinflamatorios en el intestino entre los ratones HTZ y HZ. Estos resultados demuestran que el deterioro cognitivo en los ratones 5xFAD no se debe exclusivamente a la acumulación de A $\beta$ . Otros factores, como la señalización alterada de PI3K-Akt, las vías metabólicas relacionadas con la insulina y los cambios en el microbiota intestinal, contribuyen a la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, enfocarse únicamente en el depósito de A $\beta$  puede resultar insuficiente para dar una respuesta correcta al tratamiento de la EA. La comprensión de la complejidad de la patogénesis de la EA y sus diversos factores contribuyentes es crucial para el desarrollo de terapias efectivas.

## Transcending the amyloid-beta dominance paradigm in Alzheimer's disease: An exploration of behavioural, metabolic, and gut microbiota phenotypes in 5xFAD mice

Dina Medina-Vera<sup>a,b,c,d</sup>, Emma N. Zambrana-Infantes<sup>e</sup>, Antonio J. López-Gamero<sup>a,f</sup>, Julia Verheul-Campos<sup>a</sup>, Luis J. Santín<sup>e</sup>, Elena Baixeras<sup>g</sup>, Juan Suarez<sup>a,h</sup>, Francisco J. Pavon<sup>a,d</sup>, Cristina Rosell-Valle<sup>a,\*</sup>, Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina-IBIMA, Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, 29010 Málaga, Spain

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos s/n, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain

<sup>c</sup> Facultad de Medicina, Campus de Teatinos s/n, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain

<sup>d</sup> Unidad de Gestión Clínica del Corazón—CIBERCV (Enfermedades Cardiovasculares), Hospital Universitario Virgen de la Victoria, 29010 Málaga, Spain

<sup>e</sup> Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento, Facultad de Psicología, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain

<sup>f</sup> University of Bordeaux, INSERM, Neurocentre Magendie, U1215, 33000 Bordeaux, France

<sup>g</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain

<sup>h</sup> Departamento de Anatomía Humana, Medicina Legal e Historia de la Ciencia, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Akt pathway  
Cognitive impairment  
Insulin resistance  
hippocampus  
Microbiota  
Neuroinflammation

### ABSTRACT

The amyloid cascade hypothesis is widely accepted as an explanation for the neuropathological changes in Alzheimer's disease (AD). However, the role of amyloid-beta ( $A\beta$ ) as the sole cause of these changes is being questioned. Using the 5xFAD mouse model of AD, we investigated various factors contributing to neuropathology, including genetic load (heterozygous (HTZ) versus homozygous (HZ) condition), behavioural phenotype, neuropathology markers, metabolic physiology, and gut microbiota composition at early (5 months of age) and late (12 months of age) stages of disease onset, and considering both sexes. At 5 months of age, both HTZ and HZ mice exhibited hippocampal alterations associated with  $A\beta$  accumulation, leading to increased neuroinflammation and disrupted PI3K-Akt pathway. However, only HZ mice showed cognitive impairment in the Y-maze and Morris water maze tests, worsening with age. Dysregulation of both insulin and insulin secretion-regulating GIP peptide were observed at 5 months of age, disappearing later. Circulating levels of metabolic-regulating hormones, such as Ghrelin and resistin helped to differentiate HTZ mice from HZ mice. Differences between HTZ and HZ mice were also observed in gut microbiota composition, disrupted intestinal barrier proteins, and increased proinflammatory products in the intestine. These findings suggest that cognitive impairment in 5xFAD mice may not solely result from  $A\beta$  aggregation. Other factors, including altered PI3K-Akt signalling, disrupted insulin-linked metabolic pathways, and changes in gut microbiota, contribute to disease progression. Targeting  $A\beta$  deposition alone may not suffice. Understanding AD pathogenesis and its multiple contributing factors is vital for effective therapies.

**Citation:** Medina-Vera, D., Zambrana-Infantes, E.N., López-Gamero, A.J., Verheul-Campos, J., Santín, L.J., Baixeras, E., Suarez, J., Pavon, F.J., Rosell-Valle, C. and de Fonseca, F.R. Transcending the amyloid-beta dominance paradigm in Alzheimer's disease: An exploration of behavioural, metabolic, and gut microbiota phenotypes in 5xFAD mice. *Neurobiology of disease* **2023**, 187, p.106295.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106295>

7.5. Quinta publicación. 'Therapeutic efficacy of the inositol D-Pinitol as a multi-faceted disease modifier in the 5xFAD humanized mouse model of Alzheimer's amyloidosis', 2024. *Under revision*

En el quinto y último estudio de la tesis doctoral, se ha propuesto al DPIN como un potencial tratamiento modificador de la EA. Para comprobar esta hipótesis, se investigó si la administración oral crónica de DPIN (200 mg/kg/día) podría revertir la progresión de la enfermedad de EA en ratones 5xFAD, modelo escogido en base al estudio 4. Los resultados obtenidos han mostrado que el tratamiento en ratones 5xFAD con DPIN mejoró la función cognitiva y la flexibilidad espacial, redujo el contenido de proteína A $\beta$  e hiperfosforilación de tau en el hipocampo, aumentó la expresión de la enzima IDE, aumentó la circulación de hormonas pro-cognitivas como la grelina y la leptina, y normalizó la vía de insulina PI3K/Akt. Además, DPIN tuvo un efecto protector tanto en la barrera intestinal como en el microbioma intestinal, reduciendo el impacto proinflamatorio del intestino permeable mostrado por los ratones 5xFAD. Así, DPIN redujo la concentración circulante de LPS y la inflamación asociada (incremento de la expresión de TLR4), y normalizó la expresión de proteínas de la barrera intestinal como la claudina-3. Este efecto se asoció con una modulación del microbioma intestinal hacia una composición bacteriana más equilibrada. Por lo tanto, las asociaciones farmacológicas del DPIN en un modelo humanizado de EA, respaldan su uso para reducir el impacto de los múltiples factores que favorecen el deterioro cognitivo en las etapas tempranas de la EA, destacando su potencial como modificador del curso de la enfermedad de la EA.

# Therapeutic efficacy of the inositol D-Pinitol as a multi-faceted disease modifier in the 5xFAD humanized mouse model of Alzheimer's amyloidosis.

Dina Medina-Vera<sup>1,2,3\*</sup>, Antonio J. López-Gamero<sup>1,4</sup>, Julia Verheul-Campos<sup>1</sup>, Juan A. Navarro<sup>1,5</sup>, Laura Morelli<sup>6</sup>, Pablo Galeano<sup>6</sup>, Juan Suárez<sup>1,7,8</sup>, Carlos Sanjuan<sup>9</sup>, Beatriz Pacheco-Sánchez<sup>1</sup>, Patricia Rivera<sup>1</sup>, Francisco J. Pavon<sup>1,3</sup>, Cristina Rosell-Valle<sup>1,\*</sup>, Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>1,8,\*</sup>

## Authors information:

<sup>1</sup> Grupo de Neuropsicofarmacología, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina-IBIMA Plataforma BIONAND, Unidades Clínicas de Neurología y Salud Mental, 29010 Málaga, Spain;

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain

<sup>3</sup> Unidad de Gestión Clínica del Corazón—CIBERCV (Enfermedades Cardiovasculares), Hospital Universitario Virgen de la Victoria, 29010 Málaga, Spain

<sup>4</sup> University of Bordeaux, INSERM, Neurocentre Magendie, U1215, 33000 Bordeaux, France

<sup>5</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain

<sup>6</sup> Laboratory of Brain Aging and Neurodegeneration, Fundación Instituto Leloir (IIBBACONICET), Argentina

<sup>7</sup> Departamento de Anatomía Humana, Medicina Legal e Historia de la Ciencia, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain.

<sup>8</sup> Andalusian Network for Clinical and Translational Research in Neurology [NEURO-RECA], 29001 Málaga, Spain.

<sup>9</sup> Euronutra S.L. Calle Johannes Kepler, 3, 29590 Málaga, Spain;

## ABSTRACT

**Background:** Treatment of Alzheimer's disease (AD), the primary cause of disabling dementia, has become a significant unmet clinical need since existing therapies provide only temporal alleviation of symptoms or do not fully stop its progression, being the newest of them unaffordable for most patients. AD is a complex disease demanding simultaneous treatment of parallel pathological processes beyond amyloid beta (A $\beta$ ) deposition in the brain. Among others, these processes include central insulin resistance, tau protein hyperphosphorylation, and systemic inflammation accelerated by gut microbiota dysbiosis originating from a leaky gut. Given this context, exploring alternative therapeutic interventions capable of addressing the multifaceted components of AD aetiology is essential.

**Methods:** This study proposes D-Pinitol (DPIN), as a potential simple disease modifier treatment for AD. DPIN is a carob-pod derived inositol with insulin-sensitizing properties, an inhibitor of CDK5-mediated tau hyperphosphorylation, and a known antioxidant. To test this hypothesis, we studied whether chronic oral administration of DPIN (200 mg/kg/ day) could reverse the AD-like disease progression in the 5xFAD mice, an animal model of APP/presenilin-dependent A $\beta$  deposition.

**Results:** The results showed that treatment of 5xFAD with DPIN improved cognitive function and spatial flexibility reduced the hippocampal content of both A $\beta$  protein and hyperphosphorylated tau levels, increased the expression of insulin-degrading enzyme (IDE), boosted pro-cognitive hormone circulation such as ghrelin and leptin, and normalized the PI3K/Akt insulin pathway. In addition, DPIN has a protective effect on both, the intestinal barrier and the gut microbiota, reducing the pro-inflammatory impact of the leaky gut displayed by 5xFAD mice. Thus, DPIN reduced bacterial lipopolysaccharide (LPS), and LPS-associated inflammation and normalized the expression of intestinal barrier proteins such as Claudin-3. This effect was associated with a modulation of gut microbiota towards a more balanced bacterial composition.

**Conclusions:** In summary, the pharmacological profile of DPIN supports its use to reduce the impact of multiple factors favoring cognitive impairment in the early stages of AD. Overall, these findings emphasize the therapeutic efficacy of DPIN highlighting its potential as a disease modifier for AD.

## KEYWORDS

Alzheimer's disease, brain insulin resistance, D-Pinitol, hippocampus, A $\beta$  plaques, microbiota dysbiosis, tau phosphorylation, inflammation

## 8. Discusión

En los últimos años, los tratamientos para la enfermedad de Alzheimer se han centrado en la teoría de la cascada amiloide, que sugiere que la acumulación de amiloide en el cerebro es el elemento fundamental en la enfermedad. Esta ha sido la base de la inmunoterapia contra las formas solubles de A $\beta$ , cuya eficacia terapéutica ha sido mucho menor de la esperada. Además, estudios en linajes colombianos [40] de Alzheimer familiar han demostrado que se puede preservar la función cognitiva pese al depósito amiloide si hay un modificador genético asociado que previene el depósito de tau (mutación Christchurch). Estas discrepancias entre la aparición de la acumulación de amiloide y tau, y el deterioro cognitivo en pacientes con Alzheimer indica que nuestra comprensión de la enfermedad es posiblemente errónea y por eso los desarrollos terapéuticos no han alcanzado los objetivos esperados. Los esfuerzos actuales para el desarrollo de terapias se enfrentan a desafíos como la aparición de efectos secundarios, la capacidad de los fármacos para llegar al cerebro, las discrepancias entre estudios en animales y humanos, los enormes costos de ensayos clínicos a largo plazo o la dificultad para determinar el momento óptimo para tratar. Por tanto, es cada vez más urgente adoptar un nuevo enfoque centrado en la prevención o ralentización del avance de la enfermedad para reducir la carga social, y la dependencia, mientras la investigación reformula las hipótesis y se desarrollan nuevas estrategias terapéuticas. Para lograr esto, es esencial encontrar tanto productos/estrategias dietéticas que ayuden a modificar la enfermedad, como biomarcadores confiables que puedan adelantar el momento diagnóstico y utilizarse para iniciar tratamientos en etapas tempranas. Esto abriría nuevas posibilidades de tratamiento basadas en medicamentos que puedan administrarse de manera segura mucho antes de que aparezcan los síntomas cognitivos, o de aplicar modificadores de enfermedad que al ralentizarla otorguen al paciente una esperanza de vida libre de síntomas mayor que la que hoy día tienen.

En esta tesis doctoral, se ha investigado la efectividad del uso del DPIN, un compuesto natural que activa la señalización de insulina, como posible tratamiento para la enfermedad de Alzheimer en sus etapas iniciales actuando como modificador del curso de la enfermedad.

En los siguientes apartados, se discuten los principales resultados obtenidos en durante esta tesis doctoral.

➤ **Trazando el Camino: D-Pinitol y su Potencial Terapéutico en la Señalización de la Insulina y los Sensores Metabólicos del Hipotálamo:**

Los productos naturales con ingredientes activos que regulan el metabolismo de la glucosa están siendo más importantes para tratar trastornos crónicos como la DMT2 vinculada a la obesidad y problemas neurodegenerativos. Diferentes estudios han sugerido el uso de compuestos como los inositoles para mejorar la resistencia a la insulina, pero aún no se había estudiado su impacto en la señalización de la insulina en el hipotálamo, una región clave del cerebro para el metabolismo. Nuestros resultados muestran que el inositol DPIN derivado de la fruta de algarrobo mejora la señalización de la insulina al activar la vía de señalización PI3K/Akt, lo que facilita la captación de glucosa. Además, se produce una disminución temporal en los niveles de insulina seguidos de una recuperación, sin que los niveles de glucosa oscilen anómalamente gracias a una regulación adicional de hormonas como el glucagón. Estos hallazgos sugieren que el DPIN en el hipotálamo (por tanto, quizás en el resto del cerebro) reemplazaría la función de la insulina, reduciendo así la necesidad de esta hormona en los tejidos del cuerpo. La bajada de insulina y la ausencia de cambios en la glucemia son indicativos de una mejora en la sensibilidad a la insulina y la regulación de la glucosa, según los índices HOMA-IR. Nuestros resultados respaldan la idea de que DPIN activa una vía de señalización importante en el hipotálamo, lo que reduce la sobrecarga del páncreas endocrino sin causar problemas de azúcar en sangre. Además, DPIN activa mTOR y AMPK en el hipotálamo, lo que regula el gasto de energía y el apetito. Estos hallazgos plantearon un posible mecanismo para mejorar el control del azúcar en sangre y la energía corporal. A su vez, hemos podido establecer una relación directa entre la administración de DPIN y el balance glucagón-insulina-grelina, describiendo por primera vez los efectos del DPIN sobre los niveles de grelina plasmática, estudio que nos permitió el registro de una patente '*Composition and methods for enhancing or promoting the secretion of ghrelin to promote a healthy metabolic aging*' (EP3789018A1 European Patent Office [272]), en la que se protegía el uso del DPIN para un envejecimiento metabólico saludable.

➤ **Descripción de la conexión existente entre la hiperfosforilación de tau y la resistencia a la insulina; eficacia del D-Pinitol frente a la desfosforilación de la proteína tau:**

En los siguientes dos estudios, y partiendo de los hallazgos anteriores de la eficacia del DPIN como activador de la cascada de señalización de insulina en el cerebro, describimos la conexión existente entre la hiperfosforilación de tau y la resistencia a la

insulina, e investigamos el impacto del inositol DPIN en la fosforilación de tau, un fenómeno modulado por la activación de la ruta de señalización de insulina a través de PI3K/Akt.

La acumulación excesiva de tau fosforilada es una característica clave de la EA. La resistencia a la insulina, tanto a nivel periférico como central, se vincula con una mayor fosforilación de tau. Esta fosforilación excesiva de tau se asocia con problemas en diversas vías de señalización celular. Una de las principales quinasas que fosforilan tau es GSK-3 $\beta$ , quinasas regulada por Akt, una proteína de la vía de señalización de la insulina. Sorprendentemente nuestros resultados mostraron que el DPIN es capaz de reducir la fosforilación de tau en el hipocampo de la rata, sin afectar el estado basal de activación de Akt y GSK-3 $\beta$  medido por fosforilación. Esto sugiere que el inositol no actúa mediante la sensibilización a la insulina en el hipocampo para reducir la fosforilación de tau. Además, observamos que el efecto del inositol es específico según la región cerebral, ya que no hubo cambios en otras áreas como el hipotálamo o la corteza temporal. Esta selectividad anatómica de acción es muy interesante ya que el hipocampo es la estructura generadora de los déficits de memoria de los pacientes de EA. Desentrañar los mecanismos específicos de protección del hipocampo por el DPIN podría ayudar a desarrollar terapias más específicas, que no afectasen a otras zonas cerebrales.

La proteína tau es una diana común para muchas quinasas, debido a su alta cantidad de residuos de serina y treonina. Aunque se han desarrollado fármacos para inhibir quinasas que promueven esta fosforilación, como son la GSK-3 $\beta$  o la CDK5, hasta ahora no han sido efectivos en los ensayos clínicos para prevenir el deterioro cognitivo o mejorar la cognición en pacientes con Alzheimer. Nosotros investigamos los efectos del inositol DPIN en la fosforilación de tau utilizando varios anticuerpos para identificar cambios en las principales quinasas de tau como son la PKA, las quinasas ERK1/2 o la CDK5, conocidas por modular la fosforilación de tau. Descubrimos que DPIN afecta específicamente la actividad de CDK5, una quinasas importante para el desarrollo del sistema nervioso central. DPIN reduce la actividad de CDK5 modulando su activador (CDK5R1, tanto en la forma unida a membrana, p35, como la forma soluble p25), lo que lleva a una disminución en la fosforilación de tau. Es interesante la reducción de la forma p25 porque esta es capaz de unirse permanente a la CDK5, manteniéndola activada constantemente. Estos hallazgos sugieren que los inositoles, como DPIN, podrían ser prometedores para el tratamiento de trastornos neurológicos como las tauopatías al inhibir la activación anormal de CDK5. Interesantemente, el déficit de señalización de

leptina que presentan las ratas Zucker, previene las acciones del DPIN, abriendo una puerta a la investigación sobre los mecanismos por los cuales este inositol regula la actividad de CDK5.

Después de confirmar los efectos del DPIN en la proteína tau en ratas, evaluamos su administración en un modelo de EA con taupatía, los ratones 3xTg. Confirmamos que los efectos observados en ratas se traducen a este modelo de ratones, lo que sugiere que DPIN podría ser efectivo como un tratamiento preventivo para la tauopatía. Sin embargo, existen muchas otras regiones en la proteína tau que podrían ser fosforiladas, y necesitamos investigar cómo el DPIN afecta estas regiones adicionales. Aunque la idea de usar inositoles como suplementos nutricionales para reducir la fosforilación excesiva de tau es prometedora, se necesitaban más investigaciones para comprender completamente su efectividad y los mecanismos moleculares involucrados, especialmente en la EA.

➤ **Explorando nuevos enfoques en la enfermedad de Alzheimer:  
caracterización en ratones 5xFAD:**

Para abordar los desafíos en la investigación de la enfermedad de Alzheimer, el modelo murino 5xFAD destaca por sus características: es un modelo de amiloidosis acelerada (depósito rápido de A $\beta$ ) lo que activa procesos neurodegenerativos. Esta rapidez hace muy valioso este modelo para la investigación preclínica porque permite acortar los tiempos. Al caracterizar este modelo, observamos que los ratones con una carga genética más alta (homocigotos-HZ) presentan una disfunción cognitiva más temprana y severa que aquellos con una carga genética menor (heterocigotos-HTZ), a pesar de tener alteraciones neuropatológicas similares. Ambos grupos mostraron disfunción del hipocampo, acumulación de A $\beta$ , neuroinflamación y alteraciones en la señalización de insulina-PI3K-Akt. Además, encontramos cambios en la microbiota intestinal relacionados con el envejecimiento y alteraciones en la capa epitelial del intestino delgado en ambos grupos de ratones con la edad, vinculados con la inflamación sistémica. En cuanto al comportamiento, observamos anhedonia y déficit cognitivo a los 5 meses de edad, indicando una pérdida de interés o placer junto con déficit en la formación de memoria, unos síntomas claramente asociados con la EA.

Nuestros hallazgos también muestran que las alteraciones en la microbiota intestinal, la señalización de insulina y la neuroinflamación desempeñan un papel importante en la patogénesis de la EA en este modelo. Específicamente, las diferencias en la composición de la microbiota intestinal podrían influir en la neuroinflamación y la

permeabilidad de la barrera hematoencefálica, exacerbando los síntomas de la enfermedad. Además, los cambios en la señalización de insulina pueden contribuir al deterioro cognitivo observado en los ratones HZ.

En resumen, nuestro estudio destaca la complejidad de la patogénesis de la EA y resalta la importancia de investigar los mecanismos subyacentes utilizando modelos animales relevantes como el 5xFAD. Además, cabe destacar la trascendencia más allá de la hipótesis amiloide, ya que observamos diferencias significativas en el comportamiento que no se pueden atribuir exclusivamente al depósito de A $\beta$  en un modelo claro de amiloidosis.

➤ **Impacto terapéutico del D-Pinitol como modificador multifacético en el modelo de ratón 5xFAD de la enfermedad Alzheimer:**

Por último, el último estudio realizado se centró en explorar el potencial terapéutico del inositol DPIN en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, utilizando el modelo de ratón 5xFAD previamente caracterizado. Como se describió en el artículo anterior, se observaron diversas alteraciones asociadas con la EA en estos ratones, incluyendo depósitos de A $\beta$  en el cerebro, alteraciones en la señalización de insulina, deterioro cognitivo y cambios en el metabolismo y la inflamación intestinal.

El tratamiento oral con DPIN mostró efectos beneficiosos en varios aspectos del comportamiento, la neuropatología y las vías bioquímicas relacionadas con la EA. En términos de comportamiento, el DPIN mejoró la respuesta a la recompensa (estudios de refuerzo gustativo por sabor dulce) y redujo el comportamiento atípico en el laberinto elevado en cruz, indicando una mejora en la función cognitiva y emocional. Además, se observó una mejora significativa en la memoria espacial en el laberinto de Morris, lo que sugiere una protección del hipocampo, una región cerebral crítica para la memoria, contra los efectos negativos de la EA. Estos hallazgos eran sugestivos de una mejoría en el estado funcional hipocampal/cortical.

Se pudo confirmar esta hipótesis a nivel neuropatológico, ya que el tratamiento con DPIN redujo la acumulación de placas de A $\beta$  en el hipocampo. El posible mecanismo puede ser el incremento en los niveles de la IDE, una enzima que ayuda a degradar tanto la insulina como la proteína A $\beta$ , favoreciendo la reducción de su producción y depósito. Además, el DPIN redujo la fosforilación de tau, mediante la modulación de la actividad de la CDK5. En términos de vías bioquímicas, el DPIN activó la vía de señalización PI3K/Akt, que está implicada en la regulación de la producción de A $\beta$  y la

fosforilación de tau. También se observó una normalización de los niveles de insulina y una reducción de PAI-1, implicada en la progresión de la EA.

Además, el tratamiento con DPIN tuvo efectos beneficiosos en el metabolismo y la inflamación intestinal. Normalizó los niveles de hormonas metabólicas como la leptina y la grelina, que están relacionadas con la función cognitiva, y redujo la permeabilidad intestinal y la inflamación al modular la expresión de proteínas implicadas en el mantenimiento de la barrera intestinal y la activación del receptor de inmunidad natural TLR4.

En cuanto al microbioma intestinal, el DPIN modificó la composición bacteriana, aumentando la abundancia de bacterias asociadas con la salud intestinal y reduciendo la de aquellas asociadas con enfermedades intestinales y sistémicas.

En resumen, el estudio demostró que el tratamiento con DPIN puede tener efectos terapéuticos significativos en varios aspectos de la EA, incluyendo el comportamiento, la neuropatología, las vías bioquímicas, el metabolismo y la inflamación intestinal, lo que sugiere su potencial como tratamiento modificador del curso de la enfermedad.

Por tanto, los hallazgos derivados de esta investigación no solo han mejorado nuestra comprensión de los procesos patológicos involucrados en la enfermedad de Alzheimer, sino que también proporcionan nuevas perspectivas terapéuticas dirigidas a mitigar los efectos perjudiciales de la resistencia a la insulina en el cerebro en el contexto de esta enfermedad neurodegenerativa. En concreto, el DPIN como un nutraceutico propuesto en esta tesis doctoral como modificador del curso de la EA.

### 8.1. Limitaciones

Este estudio nos ha permitido conocer mejor cómo funciona un modelo animal relevante para entender la EA. Sin embargo, hay algunas áreas cerebrales (no solo el hipocampo) que aún necesitan ser exploradas para entender completamente cómo estos factores contribuyen al desarrollo de la enfermedad en cada individuo, especialmente en relación con el deterioro cognitivo. Esto es importante porque entender estos mecanismos podría ayudarnos a identificar intervenciones que podrían detener o ralentizar la progresión de la enfermedad.

Es importante tener en cuenta que este estudio utilizó ratones transgénicos, lo que podría tener limitaciones intrínsecas del modelo. Aunque hasta ahora no se han observado efectos negativos en los transgenes utilizados, existe la posibilidad de que

puedan afectar a otras partes del ADN que no codifican proteínas, como las regiones reguladoras. Por lo tanto, debemos ser cautelosos al interpretar los resultados y seguir investigando para comprender mejor cómo funcionan estos tratamientos en modelos animales transgénicos para poder hacer una traslación hacia la clínica.

Una desventaja de utilizar el modelo 5xFAD es que no desarrolla las características de la EA relacionadas con la formación de NFTs a nivel histopatológico. Hay otros modelos que si lo hacen, aunque ningún modelo murino alcanza la severidad de las alteraciones observadas en pacientes humanos. Por ejemplo, los ratones 3xTg tienen una mutación en *MAPT*, además de en *APP* y *PSEN1*, lo que conduce a la formación de ovillos de tau hiperfosforilada y los convierte en buen candidato para estudios futuros sobre la influencia de ciertos compuestos en la hiperfosforilación de tau, como DCI y DPIN. Sin embargo, este modelo también tiene sus limitaciones, ya que la mutación en *MAPT* presente en los ratones 3xTg no se ha observado en pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar, y además no muestran un patrón claro de muerte neuronal como en los humanos con la enfermedad. A pesar de estas limitaciones, se eligió el modelo de ratón 5xFAD para este estudio debido a su facilidad de uso y su similitud con la enfermedad humana.

Dado que el objetivo del estudio era administrar DPIN desde una edad temprana de 6 meses, cuando comienzan a aparecer algunos síntomas cognitivos en los ratones 5xFAD, hasta los 8-10 meses de edad, cuando el deterioro cognitivo es más pronunciado, se decidió administrar el DPIN en las botellas de agua. Se calculó la cantidad promedio de agua que bebían los ratones 5xFAD cada día y se evaluó si mostraban aversión al sabor ligeramente dulce del DPIN. Este método de administración ya se ha utilizado en otros estudios para evaluar la señalización de insulina del DPIN en el hipotálamo, y previa farmacocinética para conocer la concentración adecuada del producto administrado. Aunque este enfoque imita la manera en que las personas toman suplementos alimenticios, no es posible garantizar ni controlar que los ratones consuman la misma cantidad de DPIN todos los días.

En nuestro estudio sobre la microbiota, a partir de los 5 meses de edad (inicio del estudio), los animales fueron alojados individualmente en jaulas en la misma sala. Los ratones son animales que prefieren estar en grupo, por lo que separarlos de sus hermanos de camada puede causarles estrés. Sin embargo, esta separación fue necesaria para llevar a cabo el análisis de las heces de forma individualmente. Se hizo todo lo posible para controlar el impacto del aislamiento de los animales en las condiciones más óptimas con un fuerte enriquecimiento ambiental.

En resumen, aunque este estudio muestra prometedores efectos terapéuticos del tratamiento con DPIN en varios aspectos de la EA, como el comportamiento, la neuropatología y la inflamación intestinal, aún queda mucho por investigar para entender completamente cómo funcionan estos tratamientos y su traslación a pacientes humanos con EA. Es fundamental continuar investigando para mejorar nuestro conocimiento y encontrar tratamientos más efectivos para esta enfermedad.

## 8.2. Líneas futuras de investigación

Gracias a estudios de proteómica hemos identificado que en el hipocampo de los 5xFAD hay una desregulación del sistema glinfático caracterizada por alteraciones en acuaporinas y transportadores de iones, posiblemente localizados en astrocitos. El tratamiento con D-Pinitol puede revertir los cambios inducidos por la presencia del transgén 5XFAD en el hipocampo del ratón. Por tanto, uno de los objetivos es analizar la desregulación de las aquaporina, marcadores astrocíticos, y transportadores de iones en el hipocampo de animales controles y 5xFAD tratados con DPIN. Por otro lado, la proteómica también nos ha permitido observar que En el hipocampo de los ratones 5xFAD hay una agregación de proteínas hiperfosforiladas caracterizada por la desregulación en la fosforilación de neurofilamentos. Conociendo el efecto del DPIN sobre la quinasa CDK5, reduciendo su actividad, se continuará la investigación del papel DPIN sobre la mejora de la hiperfosforilación de los neurofilamentos en el modelo animal 5xFAD.

Además de la investigación preclínica, existe una propuesta en investigación clínica. Para ello, se ha pedido un proyecto innovador que pretende desarrollar una plataforma de biotecnología (PLABIFEN) capaz de extraer y purificar el D-Pinitol como un ingrediente activo con calidad farmacéutica (GMP) desde fuentes naturales y aplicarlo para enfermedades neurodegenerativas (por quejas subjetiva de memoria, como ocurre en la EA). El presente proyecto se presenta, por tanto, como una propuesta vanguardista que responde a la demanda de tratamientos más seguros, efectivos, naturales y accesibles a toda la población, y que nacen de una propuesta innovadora, accesible y de aprovechamiento de recursos naturales. Los objetivos científicos en deterioro cognitivo/EA, se centran en determinar la eficacia del D-Pinitol en la evolución de los sujetos con queja subjetiva de memoria que recibirán D-Pinitol diariamente durante dos años. Esta tesis doctoral representa un punto de partida inicial hacia la creación de productos naturales en colaboración entre empresa y organismos públicos de investigación.

## 9. Conclusiones

1. El D-Pinitol (DPIN) es un compuesto natural activo administrado por vía oral, que ejerce un efecto estimulante en la señalización de la insulina, extendiéndose más allá de los tejidos periféricos.
2. La señalización de insulina en el cerebro disminuye con el envejecimiento, lo que señala a la resistencia a la insulina como un factor de riesgo importante en enfermedades neurodegenerativas. Esto sugiere que mejorar la sensibilidad a la insulina podría ofrecer beneficios para los pacientes afectados por trastornos asociados con la resistencia cerebral a la insulina, como la enfermedad de Alzheimer.
3. Se ha establecido una asociación entre la resistencia a la insulina y la hiperfosforilación de la proteína tau, una característica distintiva de la enfermedad de Alzheimer. La administración del inositol DPIN fue capaz de reducir la fosforilación de tau en el hipocampo.
4. La administración de DPIN induce la inhibición de CDK5, una quinasa relacionada con la fosforilación de tau, lo que se propone como un posible mecanismo para la defosforilación de tau en el hipocampo. Estas acciones de DPIN fueron específicas y no afectaron a otras proteínas reguladoras de tau, lo que proporciona un perfil farmacológico único para este inositol natural.
5. El deterioro cognitivo en el modelo de ratón 5xFAD de la enfermedad de Alzheimer, no se atribuye exclusivamente a la acumulación de A $\beta$ , sino que también está influenciado por otros factores. La señalización alterada de PI3K-Akt, las vías metabólicas relacionadas con la insulina y los cambios en el microbiota intestinal son elementos que contribuyen a la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, centrarse únicamente en la deposición de A $\beta$  es insuficiente para comprender y tratar la enfermedad de Alzheimer.
6. El tratamiento con DPIN en ratones 5xFAD resultó en mejoras significativas en múltiples aspectos cognitivos e histopatológicos. Por lo tanto, las asociaciones farmacológicas del DPIN en un modelo humanizado de EA, respaldan su uso para reducir el impacto de los múltiples factores que favorecen el deterioro cognitivo en las etapas tempranas de la EA, destacando su potencial como modificador del curso de la enfermedad de la EA.

## 10. English summary and conclusions

### 10.1. Introduction

The main focus of this research has been on the study of the nutraceutical D-Pinitol, a natural compound derived from inositol provided by the company Euronutra S.L. This product (Caromax®-D-Pinitol (DPIN)) has been used for our studies on attenuating cerebral insulin resistance and its relationship with associated chronic diseases, such as Alzheimer's disease (AD), using humanized preclinical models of the disease (5xFAD mice).

In the field of neuroscience research, understanding the mechanisms underlying neurodegenerative diseases such as AD has been the subject of continuous study. AD is a neurodegenerative age-related pathology of great relevance in the health field, posing both clinical and social challenges. It is characterised by the progressive deterioration of cognitive functions and memory loss [10], affecting millions of people worldwide and impacting not only the individuals who suffer from it but also their families and communities [9]. The uniqueness and complexity of AD are evidenced by the accumulation of amyloid plaques and hyperphosphorylation of tau protein in the brain, leading to neuronal dysfunction and ultimately cognitive decline [20,21]. To successfully address this difficult public health issue, it is imperative to comprehend the various elements that contribute to its aetiology as research into preventative and treatment techniques intensifies.

Although insulin is primarily known for regulating blood sugar and peripheral metabolism, it also plays crucial roles in the brain [5]. Specifically, brain insulin regulates glucose metabolism, and modulates neurotransmission, and cell survival [6]. An emerging line of research suggests that insulin resistance, both peripherally and centrally, may play a crucial role in the pathological processes associated with AD, including those related to cognition, neuroinflammation, and amyloid pathology neurodegeneration [7]. Multiple studies have documented the presence of insulin resistance in patients with this disease, suggesting an intrinsic connection between glucose metabolism and disease development [8,157,162,273,274]. The decrease in the ability of brain cells to respond to insulin may contribute to the development and progression of the disease [7,166,275,276].

Moreover, type 2 diabetes mellitus (DMT2) is increasingly being closely associated with AD. Some authors have even proposed the term 'type 3 diabetes' for this association. Several studies indicate that AD is a specific brain form of diabetes. There are links

between AD and DMT2 through mitochondrial alterations and oxidative stress, altered energy and glucose metabolism, cholesterol modifications, amyloid plaque formation, altered A $\beta$  metabolism, and tau hyperphosphorylation. Additionally, brains with AD show defective insulin signaling, altered levels and aberrant activation of insulin signaling pathway components, and most importantly, decreased insulin responsiveness. In this context, understanding the underlying mechanisms contributing to the development and progression of this disease has become imperative [169,170,174].

AD-associated dementia represents a significant challenge affecting a considerable proportion of the elderly population [60]. Given its chronic nature and prolonged course, careful planning of care and intervention strategies are of vital importance. In the early stages of the disease, the focus on diagnosis, early detection, and treatment of potentially reversible conditions becomes crucial. The course of action taken when diagnosing the disease is symptom treatment using cholinesterase inhibitors [237]. This offers a temporary window of a few years for improving cognitive and functional symptoms in the early to moderate stages of the disease. However, these treatments focus on symptom relief but fail to alter the course of the disease significantly. Therefore, there is an urgent need to find therapeutic approaches that can slow down the progression of the disease, making the evolution slower and thus resulting in an improvement in the quality of life of patients. In other words, there is a need to find a disease modifier. Immunotherapy has emerged as a possible option to modify the course of AD [277], but its high cost and limited accessibility pose significant barriers. In contrast, natural products offer a promising alternative as they target known therapeutic targets, can prove their efficacy, and are more economically accessible.

In Spain, nutraceutical interventions such as Souvenaid are used in patients with memory complaints to slow down ageing [253]. Both have a composition containing a combination of Omega-3 fatty acids, vitamin D3, and B-group vitamins. This composition poses a challenge in its production as they are magistral mixtures, meaning complex and costly mixtures. The solution we propose is the case of carob inositols, which can be extracted, purified, and safely administered. Among these inositols present in the carob, DPIN has been selected due to its history as an insulin sensitizer and its ability to improve cognitive impairment in diet-induced obesity models associated with neurodegeneration [254].

Nutraceuticals are food products that provide health benefits, either through their nutritional properties or the biologically active compounds they contain. In the medical field, nutraceuticals play a crucial role in preventing, treating, or improving specific health

conditions. It has been identified that DPIN is found in plants traditionally used in herbal remedies for diabetes. DPIN, a bioactive compound with insulin-like properties, is naturally found in inositol-derived plants, especially in carob fruits (*Ceratonia siliqua*) [213], where it is found in high concentrations. It is postulated that its action occurs through its integration into glycans, considered mediators of insulin signaling, thus favoring the insulinogenic response. In this doctoral thesis, the effectiveness of using DPIN, a natural compound that activates insulin signaling, has been investigated as a possible treatment for Alzheimer's disease in its early stages by acting as a disease-modifying agent.

## 10.2. Hypotheses and objectives

In this context, the following hypotheses and work objectives are proposed:

**General hypothesis:** Alzheimer's disease is an insulin resistance-associated condition that can be studied in humanized murine models such as 5xFAD. Through this model, we could develop an effective and affordable therapy that can modify the course of the disease. Therefore, our research has been focused on understanding the impact of D-Pinitol in Alzheimer's disease due to its background as an insulin sensitizer and cognitive improvement agent, as well as its potential as a nutraceutical to enhance the quality of life of affected patients.

### Specific hypotheses:

**H1:** Natural products, such as D-Pinitol, are capable of modulating insulin resistance and other pathological aspects associated with neurodegeneration in animal models. This positions them as promising candidates for the treatment of disorders linked to cerebral insulin resistance (product research).

**H2:** We propose Alzheimer's disease as an insulin resistance-associated condition that can be studied in humanized murine models. In this regard, the 5xFAD murine model, which exhibits amyloid deposits, neurodegeneration, and insulin resistance, serves as a valuable tool for studying D-Pinitol as an insulin sensitizer in the brain and as a modifier of Alzheimer's disease course (model research).

**H3:** It is postulated that disruption in insulin signaling triggers pathological cascades that promote amyloid plaque accumulation, tau hyperphosphorylation, and activation of inflammatory processes, thus contributing to the cognitive decline observed in Alzheimer's disease patients. Due to the close relationship between the insulin signaling

pathway and tau, it is hypothesized that the compound D-Pinitol influences the phosphorylation state of the tau protein.

**H4:** The effect of D-Pinitol treatment in the Alzheimer's mouse model 5xFAD will provide a therapeutic alternative that will open new horizons in Alzheimer's disease research (product applicability research on the model).

Addressing these specific hypotheses will require a comprehensive evaluation of the molecular and cellular mechanisms underlying the interaction between insulin resistance and amyloid pathology and tau hyperphosphorylation in the brain. It is anticipated that the findings derived from this research will not only improve our understanding of the pathological processes involved in Alzheimer's disease but may also provide new therapeutic perspectives aimed at mitigating the harmful effects of insulin resistance in the brain in the context of this neurodegenerative disease.

Based on the stated hypothesis, five general objectives are proposed, each with its corresponding **specific objectives**:

- ✓ **Objective 1:** Research on the D-Pinitol product: description of the mechanism of action of D-Pinitol and its therapeutic potential in insulin signaling and hypothalamic metabolic sensors.

Specific objectives:

**1.1.** Researching the acute impact of Caromax®-D-Pinitol inositol to examine its ability to modulate insulin signaling pathway: exploring the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway in the hypothalamus after acute oral administration of D-Pinitol in Wistar rats, analyzing the phosphorylated and total forms of proteins in the signaling cascade.

**1.2.** Evaluation of D-Pinitol concentration, glucose, and peripheral hormones in plasma.

**1.3.** Analysis of metabolic sensors mTOR and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in the hypothalamus and their potential regulation by DPIN after administration.

- ✓ **Objective 2:** Description of the efficacy of D-Pinitol against tau protein dephosphorylation. Examination of the pharmacological impact of DPIN on insulin signaling and tau phosphorylation, now focusing on the hippocampus of Wistar and Zucker rats (induced obesity model).

Specific objectives:

**2.1.** Measurement of DPIN plasma concentrations in Wistar and Zucker rats to determine active plasma levels of DPIN after repeated oral administration of the compound.

**2.2.** Evaluation of the impact of chronic oral administration of DPIN on PI3K/Akt-dependent signaling and the phosphorylation state of tau protein and its major kinases in the hippocampus of Wistar and Zucker rats.

**2.3.** Examination of the tau phosphorylation state after DPIN administration in an established tauopathy animal model (3xTg).

- ✓ **Objective 3:** Description of the humanized murine model of 5xFAD mice.

Specific objectives:

**3.1.** Establishment of a colony of heterozygous (HTZ) and homozygous (HZ) 5xFAD transgenic mice in two different age groups to represent early and late onset of the disease, considering both sexes.

**3.2.** Exploration of various factors influencing neuropathology, ranging from genetic load to behavioral phenotype: conducting a battery of neurological procedures to evaluate somatosensory and sensorimotor reflexes, anhedonia, emotional state, anxiety-like behavior, and spatial working memory of HTZ and HZ mice at different ages.

**3.3.** Evaluation of genetic load regarding A $\beta$  deposition pattern in HTZ and HZ mice, quantifying A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, and total A $\beta$  in the dentate gyrus (DG), CA1, and CA3 regions of the hippocampus. **3.4.** Analysis of plasma levels of peptides involved in insulin release and PI3K/Akt signaling cascade to evaluate insulin-related metabolic pathways.

**3.5.** Analysis of taxonomic composition of intestinal microbiota and alteration of intestinal epithelial lining integrity according to genotype and age.

**3.6.** Principal component analysis (PCA) study to investigate how cognitive differences (from objective 2.2) and pathophysiological alterations (from objectives 2.3, 2.4, and 2.5) observed in the 5xFAD transgenic animal model at 5 and 12 months of age correlate.

- ✓ **Objective 4:** Bibliographic description of the connection between tau hyperphosphorylation and insulin resistance.

Specific objectives:

**4.1.** Explore interconnections between tauopathies, cerebral insulin resistance, and inositols to identify new potential modifiers for Alzheimer's disease.

- ✓ **Objective 5:** Analysis of the therapeutic impact and applicability of D-Pinitol as a multifaceted modifier of Alzheimer's disease in the early age 5xFAD mouse model.

Specific objectives:

- 5.1.** Evaluation of anhedonic and emotional behavior, learning, and memory of D-Pinitol-treated 5xFAD mice.
- 5.2.** Analysis of plasma levels of peptides and hormones involved in modulating insulin release, and PI3K/Akt signaling and cascade.
- 5.3.** Examination of key Alzheimer's disease protein markers: tau protein, A $\beta$  protein, and insulin-degrading enzyme (IDE, a major protease that degrades A $\beta$  in the brain).
- 5.4.** Effects of D-Pinitol treatment on intestinal barrier function and immune response in the small intestine of 5xFAD mice: analysis of claudin-3 and occludin expression, as well as TLR4 expression in the intestine and lipopolysaccharides (LPS) in plasma.
- 5.5.** Analysis of the taxonomic composition of intestinal microbiota after D-Pinitol treatment.

Therefore, this doctoral thesis seeks to explore the impact of DPIN, an insulin sensitizer, on the brain and its ability to modify physiological aspects related to AD in the 5xFAD humanized animal model.

### 10.3. Main results

The following are the works presented to support this doctoral thesis (a copy of the original published papers can be found in section 7 named '*Resultados*')

- 10.3.1. First block. 'Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway in Rat Hypothalamus Induced by an Acute Oral Administration of D-Pinitol', 2021

Currently, the complex relationship between insulin, glucose metabolism, and inositol-related molecules is poorly understood. The first study (Section 7 of Results, **7.1**) of the doctoral thesis aimed to address this intricate network the pharmacological effects of DPIN administration on insulin signaling pathway activation via PI3K/Akt in the hypothalamus, a metabolically sensitive regulatory center. The results of this study assessed not only the potential regulatory effects of DPIN on the insulin signaling pathway in the hypothalamus but also the functional status of metabolic sensors,

providing a basis for establishing the potential utility of inositol as a new therapeutic target in disorders associated with brain insulin resistance. The studies were conducted in Wistar rats following acute oral administration of natural inositol DPIN, considering the compound's temporal dependence. The study initially addressed the impact of DPIN oral administration on its plasma concentrations, as well as those of glucose and peripheral hormones with metabolic roles such as insulin, glucagon, and IGF-1. Then, the phosphorylated and total forms of signaling proteins were analyzed. Finally, metabolic sensors, mTOR, and AMPK in the hypothalamus, as well as their possible regulation by DPIN post-administration, were considered. The results indicate that acute DPIN administration induced time-dependent phosphorylation of PI3K/Akt and its related substrates in the hypothalamus, suggesting activation of the insulin signaling pathway. More specifically, DPIN triggers Akt activation and, in turn, its kinase substrates: GSK-3 $\beta$ , mTOR, and GS. This activation profile is consistent with DPIN acting as an insulin sensitizer, as a decrease in circulating insulin concentration was also observed. The pharmacological actions of DPIN in the hypothalamus via the PI3K/Akt pathway were observed when administered to fasting animals. Insulin signaling in the brain is known to decline with aging, and insulin resistance has been identified as a major risk factor in neurodegenerative diseases. This suggests that improving insulin sensitivity could be beneficial for patients with disorders associated with brain insulin resistance, such as AD. These findings support the idea that DPIN could be a candidate for treating disorders associated with brain insulin resistance by activating the insulin response beyond the insulin receptor.

10.3.2. Second block. 'D-Pinitol promotes tau dephosphorylation through a cyclin-dependent kinase 5 regulation mechanism: A new potential approach for tauopathies?', 2022

Recent research establishes a connection between insulin resistance in the brain and neurodegenerative diseases, where the presence of hyperphosphorylated tau protein contributes to the deterioration of neuronal cells. In a second study (Section 7 of Results, **7.2**), we aimed to determine whether DPIN, recognized for its ability as an insulin sensitizer, had any impact on the level of tau protein phosphorylation, which is regulated among other signaling pathways by insulin. To do this, the pharmacological effects of DPIN on the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /tau chain in the hippocampus of normoglycemic Wistar rats and Zucker diabetic rats due to leptin signaling deficiency were examined using the Western Blot technique. Additionally, the functional status of additional kinases involved in tau phosphorylation, such as PKA, ERK1/2, AMPK, and CDK5, was explored. Surprisingly, it was discovered that oral treatment with DPIN significantly reduced tau

phosphorylation, but not through the expected regulation of GSK-3 $\beta$  kinase. After an exhaustive search for additional kinases that influence tau phosphorylation, it was identified that this effect was carried out through a mechanism dependent on the reduction of CDK5 activity, primarily through the regulatory proteins p35 and p25, considered CDK5 receptors (CDK5R1). This effect was not observed in leptin-deficient Zucker rats, revealing that the combination of leptin deficiency, obesity, dyslipidemia, and hyperinsulinemia nullifies DPIN's actions on tau phosphorylation. Finally, the 3xTg mouse model was used as a control group for tauopathies, as it presents tau mutations that promote the phosphorylation and aggregation of this protein. The 3xTg mice confirmed the efficacy of DPIN in reducing tau phosphorylation in this humanized model of AD. In conclusion, the results suggest that DPIN, by regulating CDK5 activity through the reduction of CDK5R1, could be developed as a promising drug for the treatment of neurological disorders such as tauopathies.

10.3.3.Third block. 'Novel insights into D-Pinitol based therapies: a link between tau hyperphosphorylation and insulin resistance', 2023

One of the most relevant unmet medical needs to date is the availability of effective and accessible therapies for preventing dementia associated with major neurodegenerative disorders, including the most common, AD. Current pharmacological developments aimed at reducing cognitive symptoms (cholinesterase inhibitors) or amyloid A $\beta$  burden only demonstrate moderate efficacy, acting as symptomatic treatments or disease-modifying agents. Additionally, one of the main obstacles hindering successful pharmaceutical developments is the lack of a consistent etiopathogenic hypothesis for sporadic AD, which accounts for over 95% of cases. New metabolic hypotheses (e.g., brain insulin resistance, metabolic alterations of brain lipids, or tau protein hyperphosphorylation) are being developed in an attempt to identify relevant key targets for new drugs capable of modifying the disease course. Among them, the discovery of the necessity of tau hyperphosphorylation and deposition (tauopathies) for dementia development has established tau protein phosphorylation as a target for disease-modifying agents in these neurodegenerative diseases. Among the multiple causes of tau hyperphosphorylation, brain insulin resistance has garnered much attention, and inositols as insulin sensitizers are currently being considered as candidates for drug development. In this third study, in this case, a literature review (Section 7 of Results, **7.3**), we address the plausible interconnection between these three aspects: tauopathies, cerebral insulin resistance, and inositols, which could eventually help identify targets for new disease-modifying agents such as AD, offering hope to the millions affected by this devastating disease. With these studies conducted and the close

relationship between insulin, AD, and tau, possible mechanisms of action of DPIN in AD have been proposed, and an overview of DPIN's pharmacological development targets in AD has been presented. As a final reflection, the possibility that future treatments for AD may include pharmacological and dietary adjustments in insulin and glucose management, such as inositols, as a complement to new therapies under development, is discussed.

10.3.4. Fourth block. 'Transcending the amyloid-beta dominance paradigm in Alzheimer's disease: An exploration of behavioural, metabolic, and gut microbiota phenotypes in 5xFAD mice', 2023

The amyloid cascade theory is widely accepted as an explanation for the changes in brain tissue observed in AD. However, it is questioned whether the A $\beta$  peptide is the sole cause of these changes. Intending to investigate whether cognitive decline in AD is solely associated with the presence of A $\beta$  in the brain or if other elements influence the disease's progression, we conducted this fourth study (Section 7 of Results, **7.4**) in which a more detailed analysis of the 5xFAD mouse model of AD has been carried out. This humanized model develops accelerated cerebral amyloidosis. Various factors contributing to neuropathology have been explored in this study, including genetic load (transgene expression in homozygosis (HZ) or heterozygosis (HTZ)), behavior, neuropathology markers, metabolic physiology, intestinal barrier permeability, and intestinal microbiome composition at early (5 months of age) and advanced (12 months of age) stages of the disease, considering also the sex factor (males vs females). The results show that at an early age, both HTZ and HZ mice presented hippocampal alterations related to A $\beta$  accumulation, leading to increased neuroinflammation and disruption of the PI3K-Akt pathway. However, only HZ mice exhibited cognitive impairment in behavioral tests such as the Y-maze and the Morris water maze, worsening with age. Additionally, altered regulation of insulin secretion and the regulatory peptide GIP was observed in 5-month-old mice, disappearing later with age. Circulating levels of metabolic regulatory hormones, such as ghrelin and resistin, allowed differentiation between HTZ and HZ mice. Differences in intestinal microbiome composition, alteration of intestinal barrier proteins, and increased pro-inflammatory products in the intestine were also evidenced between HTZ and HZ mice. These results demonstrate that cognitive decline in 5xFAD mice is not exclusively due to A $\beta$  accumulation. Other factors, such as altered PI3K-Akt signaling, insulin-related metabolic pathways, and changes in the intestinal microbiota, contribute to disease progression. Therefore, focusing solely on A $\beta$  deposition may be insufficient to provide

a correct response to AD treatment. Understanding the complexity of AD pathogenesis and its various contributing factors is crucial for the development of effective therapies.

10.3.5. Fifth block. 'Therapeutic efficacy of the inositol D-Pinitol as a multifaceted disease modifier in the 5xFAD humanized mouse model of Alzheimer's amyloidosis', 2024

In the fifth and final study of the thesis (Section 7 of Results, **7.5**), we proposed DPIN as a potential modifier treatment for AD. To test this hypothesis, we investigated whether chronic oral administration of DPIN (200 mg/kg/day) could reverse the progression of AD in 5xFAD mice. The results showed that treatment of 5xFAD mice with DPIN improved cognitive function and spatial flexibility, reduced A $\beta$  protein content and tau hyperphosphorylation in the hippocampus, increased expression of the IDE enzyme, increased circulation of pro-cognitive hormones such as ghrelin and leptin, and normalized the insulin PI3K/Akt pathway. Furthermore, DPIN had a protective effect on both the intestinal barrier and intestinal microbiota, reducing the inflammatory impact of leaky gut shown by 5xFAD mice. Thus, DPIN reduced LPS and associated inflammation and normalized the expression of intestinal barrier proteins such as claudin-3. This effect was associated with the modulation of intestinal microbiota toward a more balanced bacterial composition. In summary, DPIN's pharmacological profile supports its use for reducing the impact of multiple factors favouring cognitive decline in the early stages of AD. Overall, these findings emphasize the therapeutic efficacy of DPIN, highlighting its potential as a disease modifier for AD.

#### 10.4. Discussion

In recent years, treatments for AD have focused on the amyloid cascade theory, which suggests that amyloid accumulation in the brain is the fundamental element in the disease. This has been the basis for immunotherapy against soluble forms of A $\beta$ , whose therapeutic efficacy has been much lower than expected. Additionally, studies in Colombian families with familial AD [40] have shown that cognitive function can be preserved despite amyloid deposition if there is an associated genetic modifier that prevents tau deposition (Christchurch mutation). These discrepancies between the appearance of amyloid and tau accumulation and cognitive decline in Alzheimer's patients indicate that our understanding of the disease is possibly flawed, and thus therapeutic developments have not met expected goals. Current efforts for therapy development face challenges such as the emergence of side effects, the ability of drugs to reach the brain, discrepancies between animal and human studies, the enormous costs of long-term clinical trials, or the difficulty in determining the optimal time to treat.

Therefore, it is increasingly urgent to adopt a new approach focused on prevention or slowing the progression of the disease to reduce the social burden and dependence, while research reformulates hypotheses and develops new therapeutic strategies. To achieve this, it is essential to find both dietary products/strategies that help modify the disease and reliable biomarkers that can advance the diagnostic moment and be used to initiate treatments in early stages. This would open up new treatment possibilities based on drugs that can be safely administered long before cognitive symptoms appear or applying disease modifiers that slow it down, giving patients a greater hope of symptom-free life than they have today.

In this doctoral thesis, the effectiveness of using DPIN, a natural compound that activates insulin signaling, has been investigated as a possible treatment for Alzheimer's disease in its early stages, acting as a disease-modifying agent.

In the following sections, the main results obtained during this doctoral thesis are discussed.

➤ **Tracing the Path: D-Pinitol and its Therapeutic Potential in Insulin Signaling and Hypothalamic Metabolic Sensors:**

Natural products containing active ingredients that regulate glucose metabolism are becoming increasingly important for treating chronic disorders such as type 2 diabetes mellitus (DMT2) linked to obesity and neurodegenerative problems. Various studies have suggested the use of compounds like inositols to improve insulin resistance, but their impact on insulin signaling in the hypothalamus, a key region of the brain for metabolism, had not yet been studied. Our results demonstrate that DPIN inositol derived from carob fruit enhances insulin signaling by activating the PI3K/Akt signaling pathway, thereby facilitating glucose uptake. Additionally, there is a temporary decrease in insulin levels followed by recovery, without abnormal fluctuations in glucose levels thanks to additional regulation by hormones such as glucagon. These findings suggest that DPIN in the hypothalamus (and possibly in the rest of the brain) would replace the function of insulin, thus reducing the need for this hormone in body tissues. The decrease in insulin and absence of changes in blood glucose levels indicate an improvement in insulin sensitivity and glucose regulation, as per HOMA-IR indices. Our results support the idea that DPIN activates an important signaling pathway in the hypothalamus, reducing the burden on the endocrine pancreas without causing blood sugar problems. Additionally, DPIN activates mTOR and AMPK in the hypothalamus, regulating energy expenditure and appetite. These findings propose a potential mechanism for improving blood sugar

control and bodily energy. Furthermore, we have established a direct relationship between DPIN administration and the glucagon-insulin-grelin balance, describing for the first time the effects of DPIN on plasma ghrelin levels, a study that allowed us to register a patent '*Composition and methods for enhancing or promoting the secretion of ghrelin to promote a healthy metabolic aging*' (EP3789018A1 European Patent Office [272]), protecting the use of DPIN for healthy metabolic aging.

➤ **Description of the existing connection between tau hyperphosphorylation and insulin resistance; effectiveness of D-Pinitol against tau protein dephosphorylation:**

The excessive accumulation of phosphorylated tau is a key feature of AD. Insulin resistance, both peripherally and centrally, is linked to increased tau phosphorylation. This excessive tau phosphorylation is associated with issues in various cellular signaling pathways. One of the primary kinases phosphorylating tau is GSK-3 $\beta$ , a kinase regulated by Akt, a protein in the insulin signaling pathway. Surprisingly, our results showed that DPIN is capable of reducing tau phosphorylation in the rat hippocampus without affecting the basal activation state of Akt and GSK-3 $\beta$  measured by phosphorylation. This suggests that inositol does not act through insulin sensitization in the hippocampus to reduce tau phosphorylation. Additionally, we observed that the effect of inositol is region-specific in the brain, as there were no changes in other areas such as the hypothalamus or temporal cortex. This anatomical selectivity of action is highly interesting as the hippocampus is the structure responsible for memory deficits in AD patients. Unraveling the specific protective mechanisms of the hippocampus by DPIN could aid in developing more targeted therapies that do not affect other brain regions.

Tau protein is a common target for many kinases due to its high serine and threonine residue content. Although drugs have been developed to inhibit kinases promoting this phosphorylation, such as GSK-3 $\beta$  or CDK5, they have not been effective in clinical trials to prevent cognitive decline or improve cognition in AD patients. We investigated the effects of DPIN inositol on tau phosphorylation using various antibodies to identify changes in key tau kinases such as PKA, ERK1/2 kinases, or CDK5, known to modulate tau phosphorylation. We discovered that DPIN specifically affects CDK5 activity, an important kinase for central nervous system development. DPIN reduces CDK5 activity by modulating its activator (CDK5R1, both membrane-bound form p35 and soluble form p25), leading to a decrease in tau phosphorylation. The reduction in p25 form is interesting because it can permanently bind to CDK5, keeping it constantly activated. These findings suggest that inositols, like DPIN, could be promising for the treatment of

neurological disorders such as tauopathies by inhibiting abnormal CDK5 activation. Interestingly, the leptin signaling deficit present in Zucker rats prevents DPIN actions, opening a door to research on the mechanisms by which this inositol regulates CDK5 activity.

After confirming the effects of DPIN on tau protein in rats, we evaluated its administration in an AD model with tauopathy, 3xTg mice. We confirmed that the effects observed in rats translate to this mouse model, suggesting that DPIN could be effective as a preventive treatment for tauopathy. However, many other regions in the tau protein could be phosphorylated, and we need to investigate how DPIN affects these additional regions. Although the idea of using inositols as nutritional supplements to reduce excessive tau phosphorylation is promising, further research is needed to fully understand their effectiveness and the involved molecular mechanisms, especially in AD.

➤ **Exploring new approaches in Alzheimer's disease: characterization in 5xFAD mice:**

To address the challenges in Alzheimer's disease research, the 5xFAD murine model stands out for its characteristics: it's a model of accelerated amyloidosis (rapid A $\beta$  deposition) that activates neurodegenerative processes. This rapidity makes this model highly valuable for preclinical research because it allows for shortened timelines. Upon characterizing this model, we observed that mice with a higher genetic burden (homozygotes-HZ) exhibit earlier and more severe cognitive dysfunction than those with a lower genetic burden (heterozygotes-HTZ), despite having similar neuropathological alterations. Both groups showed hippocampal dysfunction, A $\beta$  accumulation, neuroinflammation, and alterations in insulin-PI3K-Akt signaling. Additionally, we found changes in the intestinal microbiota related to aging and alterations in the epithelial layer of the small intestine in both groups of mice with age, linked to systemic inflammation. Regarding behavior, we observed anhedonia and cognitive deficits at 5 months of age, indicating a loss of interest or pleasure along with deficits in memory formation, symptoms clearly associated with AD.

Our findings also demonstrate that alterations in intestinal microbiota, insulin signaling, and neuroinflammation play a significant role in the pathogenesis of AD in this model. Specifically, differences in the composition of the intestinal microbiota could influence neuroinflammation and blood-brain barrier permeability, exacerbating disease

symptoms. Additionally, changes in insulin signaling may contribute to the cognitive decline observed in HZ mice.

In summary, our study highlights the complexity of AD pathogenesis and underscores the importance of investigating underlying mechanisms using relevant animal models like 5xFAD. Furthermore, it's worth noting the significance beyond the amyloid hypothesis, as we observed significant differences in behavior that cannot be solely attributed to A $\beta$  deposition in a clear model of amyloidosis.

➤ **Therapeutic impact of D-Pinitol as a multifaceted modifier in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease:**

Finally, the last conducted study focused on exploring the therapeutic potential of DPIN in the context of Alzheimer's disease, utilizing the previously characterized 5xFAD mouse model. As described in the previous article, various alterations associated with AD were observed in these mice, including A $\beta$  deposits in the brain, alterations in insulin signaling, cognitive impairment, and changes in intestinal metabolism and inflammation.

Oral treatment with DPIN showed beneficial effects on various aspects of behavior, neuropathology, and biochemical pathways related to AD. In terms of behavior, DPIN improved reward responsiveness (taste reinforcement studies for sweet taste) and reduced atypical behavior in the elevated plus maze, indicating an improvement in cognitive and emotional function. Additionally, a significant improvement in spatial memory was observed in the Morris water maze, suggesting protection of the hippocampus, a critical brain region for memory, against the negative effects of AD. These findings were suggestive of an improvement in hippocampal/cortical functional status.

This hypothesis was confirmed at the neuropathological level, as DPIN treatment reduced A $\beta$  plaque accumulation in the hippocampus. The possible mechanism may involve an increase in IDE levels, an enzyme that helps degrade both insulin and A $\beta$  protein, favoring the reduction of their production and deposition. Additionally, DPIN reduced tau phosphorylation by modulating CDK5 activity. In terms of biochemical pathways, DPIN activated the PI3K/Akt signaling pathway, which is involved in regulating A $\beta$  production and tau phosphorylation. Normalization of insulin levels and a reduction in PAI-1, implicated in AD progression, were also observed.

Furthermore, DPIN treatment had beneficial effects on intestinal metabolism and inflammation. It normalized levels of metabolic hormones such as leptin and ghrelin, which are related to cognitive function, and reduced intestinal permeability and inflammation by modulating the expression of proteins involved in maintaining the intestinal barrier and activating the TLR4 natural immunity receptor.

Regarding the intestinal microbiome, DPIN modified bacterial composition, increasing the abundance of bacteria associated with intestinal health and reducing those associated with intestinal and systemic diseases.

In summary, the study demonstrated that DPIN treatment may have significant therapeutic effects on various aspects of AD, including behavior, neuropathology, biochemical pathways, metabolism, and intestinal inflammation, suggesting its potential as a disease-modifying treatment. Therefore, the findings derived from this research have not only improved our understanding of the pathological processes involved in Alzheimer's disease but also provided new therapeutic perspectives aimed at mitigating the detrimental effects of insulin resistance in the brain in the context of this neurodegenerative disease. Specifically, DPIN as a proposed nutraceutical in this doctoral thesis as a disease-modifying treatment for AD.

#### 10.4.1. Limitations

This study has allowed us to gain a better understanding of how a relevant animal model works in understanding AD. However, there are some brain areas (not just the hippocampus) that still need to be explored to fully understand how these factors contribute to the development of the disease in each individual, especially about cognitive decline. This is important because understanding these mechanisms could help us identify interventions that could halt or slow down disease progression.

It is important to note that this study used transgenic mice, which may have intrinsic limitations of the model. Although no negative effects have been observed in the transgenes used so far, there is a possibility that they may affect other parts of the DNA that do not encode proteins, such as regulatory regions. Therefore, we must be cautious when interpreting the results and continue to investigate to better understand how these treatments work in transgenic animal models to translate them to the clinic.

One disadvantage of using the 5xFAD model is that it does not develop AD characteristics related to the formation of NFTs at the histopathological level. Other models do, although no murine model reaches the severity of alterations observed in

human patients. For example, 3xTg mice have a mutation in *MAPT*, in addition to *APP* and *PSEN1*, leading to the formation of hyperphosphorylated tau tangles and making them good candidates for future studies on the influence of certain compounds on tau hyperphosphorylation, such as DCI and DPIN. However, this model also has its limitations, as the mutation in *MAPT* present in 3xTg mice has not been observed in patients with familial Alzheimer's disease, and they also do not show a clear pattern of neuronal death as in humans with the disease. Despite these limitations, the 5xFAD mouse model was chosen for this study due to its ease of use and similarity to human disease.

Since the aim of the study was to administer DPIN from an early age of 6 months, when some cognitive symptoms begin to appear in 5xFAD mice, until 8-10 months of age, when cognitive decline is more pronounced, it was decided to administer DPIN in the water bottles. The average amount of water consumed by 5xFAD mice each day was calculated, and it was evaluated whether they showed aversion to the slightly sweet taste of DPIN. This method of administration has already been used in other studies to evaluate DPIN insulin signaling in the hypothalamus, and prior pharmacokinetics were conducted to determine the appropriate concentration of the administered product. Although this approach mimics how people take dietary supplements, it is not possible to guarantee or control that mice consume the same amount of DPIN every day.

In our study on the microbiota, from 5 months of age (start of the study), the animals were housed individually in cages in the same room. Mice are social animals that prefer to be in groups, so separating them from their littermates can cause stress. However, this separation was necessary to carry out an individual faecal analysis. Every effort was made to control the impact of animal isolation under the most optimal conditions with strong environmental enrichment.

In summary, although this study shows promising therapeutic effects of DPIN treatment in various aspects of AD, such as behavior, neuropathology, and intestinal inflammation, there is still much to be investigated to fully understand how these treatments work and their translation to human patients with AD. It is essential to continue researching to improve our knowledge and find more effective treatments for this disease.

## 10.5. Conclusions

1. D-Pinitol (DPIN) is an orally administered active natural compound that exerts a stimulating effect on insulin signaling, extending beyond peripheral tissues.
2. Insulin signaling in the brain decreases with aging, pointing to insulin resistance as a significant risk factor in neurodegenerative diseases. This suggests that improving insulin sensitivity could offer benefits for patients affected by disorders associated with brain insulin resistance, such as Alzheimer's disease (AD).
3. An association has been established between insulin resistance and the hyperphosphorylation of tau protein, a distinctive feature of AD. Administration of the inositol DPIN was able to reduce tau phosphorylation in the hippocampus.
4. DPIN administration induces the inhibition of CDK5, a kinase related to tau phosphorylation, proposed as a possible mechanism for tau dephosphorylation in the hippocampus. These actions of DPIN were specific and did not affect other tau-regulating proteins, providing a unique pharmacological profile for this natural inositol.
5. Cognitive decline in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease is not solely attributed to A $\beta$  accumulation but is also influenced by other factors. Altered PI3K-Akt signaling, insulin-related metabolic pathways, and changes in the intestinal microbiota are elements contributing to disease progression. Therefore, focusing solely on A $\beta$  deposition is insufficient to understand and treat AD.
6. Treatment with DPIN in 5xFAD mice resulted in significant improvements in multiple cognitive and histopathological aspects. Therefore, the pharmacological associations of DPIN in a humanized model of AD support its use to reduce the impact of multiple factors that promote cognitive decline in early stages of AD, highlighting its potential as a disease-modifying treatment for AD.

## 11. Bibliografía

1. Bates, S.H.; Jones, R.B.; Bailey, C.J. Insulin-like Effect of Pinitol. *Br J Pharmacol* **2000**, *130*, 1944–1948, doi:10.1038/sj.bjp.0703523.
2. Bevilacqua, A.; Bizzarri, M. Inositols in Insulin Signaling and Glucose Metabolism. *Int J Endocrinol* **2018**, *2018*.
3. Tetik, N.; Turhan, I.; Oziyci, H.R.; Karhan, M. Determination of D-Pinitol in Carob Syrup. *Int J Food Sci Nutr* **2011**, *62*, doi:10.3109/09637486.2011.560564.
4. Best, M.D.; Zhang, H.; Prestwich, G.D. Inositol Polyphosphates, Diphosphoinositol Polyphosphates and Phosphatidylinositol Polyphosphate Lipids: Structure, Synthesis, and Development of Probes for Studying Biological Activity. *Nat Prod Rep* **2010**, *27*, 1403–1430.
5. Agrawal, R.; Reno, C.M.; Sharma, S.; Christensen, C.; Huang, Y.; Fisher, S.J. Insulin Action in the Brain Regulates Both Central and Peripheral Functions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2021**, *321*.
6. Kleinridders, A.; Ferris, H.A.; Cai, W.; Kahn, C.R. Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. In *Proceedings of the Diabetes; 2014*; Vol. 63.
7. Kellar, D.; Craft, S. Brain Insulin Resistance in Alzheimer’s Disease and Related Disorders: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Lancet Neurol* **2020**, *19*.
8. Wei, Z.; Koya, J.; Reznik, S.E. Insulin Resistance Exacerbates Alzheimer Disease via Multiple Mechanisms. *Front Neurosci* **2021**, *15*.
9. Alzheimer’s Association 2020 Alzheimer’s Disease Facts and Figures. Alzheimer’s Association Report. *Alzheimers Dement* **2020**, *16*, 391–460.
10. Turner, R.S. Alzheimer’s Disease. In *Neurogenetics: Scientific and Clinical Advances*; 2005 ISBN 9780849358364.
11. Perrotta, G. General Overview of “Human Dementia Diseases”: Definitions, Classifications, Neurobiological Profiles and Clinical Treatments. *Gerontology & Geriatrics Studies* **2020**, *6*, doi:10.31031/ggs.2020.06.000626.
12. World Health Organization. Dementia. 15 March 2023. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
13. Mónica Mena Roa. Los Casos de Demencia Podrían Ser Más Frecuentes En El Futuro. Statista. 21 Sept 2022. Available from: <https://es.statista.com/grafico/28296/numero-estimado-de-personas-con-demencia-por-cada-1000-habitantes/>.
14. Alzheimer’s Disease International. Dementia Statistics. 2020. Available from: <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/>.

15. Ana Pérez Menéndez. Impacto Social de La Enfermedad de Alzheimer y Otras Demencias. Fundación Del Cerebro- Sociedad Española de Neurología. Sep 21, 2023. Available from: <https://www.sen.es/saladeprensa/pdf/link219.pdf> .
16. Somos Pacientes. Detección Precoz y Diagnóstico Temprano Para Salvaguardar La Calidad de Vida y Autonomía En El Alzheimer. 06 March 2022. Somos Pacientes. Available from: <https://www.somospacientes.com/noticias/sanidad/diagnostico-precoz-para-la-calidad-de-vida-y-autonomia-en-el-alzheimer/> .
17. Liang, C.S.; Li, D.J.; Yang, F.C.; Tseng, P.T.; Carvalho, A.F.; Stubbs, B.; Thompson, T.; Mueller, C.; Shin, J. II; Radua, J.; et al. Mortality Rates in Alzheimer’s Disease and Non-Alzheimer’s Dementias: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Healthy Longev* **2021**, *2*, doi:10.1016/S2666-7568(21)00140-9.
18. Alzfae. Cual Es Su Frecuencia. Fundación Alzheimer España. 23 March 2015. Available from: <https://alzfae.org/cual-es-su-frecuencia/> .
19. Garre Olmo, J. Epidemiología de La Enfermedad de Alzheimer y Otras Demencias. *Rev Neurol* **2018**, *66*, doi:10.33588/rn.6611.2017519.
20. Yu, M.; Sporns, O.; Saykin, A.J. The Human Connectome in Alzheimer Disease — Relationship to Biomarkers and Genetics. *Nat Rev Neurol* **2021**, *17*.
21. Neuner, S.M.; TCW, J.; Goate, A.M. Genetic Architecture of Alzheimer’s Disease. *Neurobiol Dis* **2020**, *143*.
22. Alzheimer’s Association 2020 Alzheimer’s Disease Facts and Figures. Alzheimer’s Association Report. *Alzheimers Dement* **2020**, *16*.
23. Villain, N.; Dubois, B.; Frisoni, G.B.; Rabinovici, G.D.; Sabbagh, M.N.; Cappa, S.; Bejanin, A.; Bombois, S.; Epelbaum, S.; Teichmann, M.; et al. Clinical Diagnosis of Alzheimer’s Disease: Recommendations of the International Working Group (IWG). *Alzheimer’s & Dementia* **2021**, *17*, doi:10.1002/alz.051167.
24. Squire, L.R.; Stark, C.E.L.; Clark, R.E. The Medial Temporal Lobe. *Annu Rev Neurosci* **2004**, *27*.
25. Didic, M.; Barbeau, E.J.; Felician, O.; Tramon, E.; Guedj, E.; Poncet, M.; Ceccaldi, M. Which Memory System Is Impaired First in Alzheimer’s Disease? *Journal of Alzheimer’s Disease* **2011**, *27*, doi:10.3233/JAD-2011-110557.
26. Kirova, A.M.; Bays, R.B.; Lagalwar, S. Working Memory and Executive Function Decline across Normal Aging, Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer’s Disease. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*.
27. Tarawneh, R.; Holtzman, D.M. The Clinical Problem of Symptomatic Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, *2*, doi:10.1101/cshperspect.a006148.
28. Hippus, H.; Neundörfer, G. The Discovery of Alzheimer’s Disease. *Dialogues Clin Neurosci* **2003**, *5*, doi:10.31887/dcons.2003.5.1/hhippus.

29. Selkoe, D.J.; Hardy, J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years. *EMBO Mol Med* **2016**, *8*, doi:10.15252/emmm.201606210.
30. Smith, E.E.; Greenberg, S.M.  $\beta$ -Amyloid, Blood Vessels, and Brain Function. *Stroke* 2009, *40*.
31. Martins, A.H.; Zayas-Santiago, A.; Ferrer-Acosta, Y.; Martinez-Jimenez, S.M.; Zueva, L.; Diaz-Garcia, A.; Inyushin, M. Accumulation of Amyloid Beta ( $A\beta$ ) Peptide on Blood Vessel Walls in the Damaged Brain after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *Biomolecules* **2019**, *9*, doi:10.3390/biom9080350.
32. Huang, H.C.; Jiang, Z.F. Accumulated Amyloid- $\beta$  Peptide and Hyperphosphorylated Tau Protein: Relationship and Links in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2009, *16*.
33. Šimić, G.; Babić Leko, M.; Wray, S.; Harrington, C.; Delalle, I.; Jovanov-Milošević, N.; Bažadona, D.; Buée, L.; de Silva, R.; Giovanni, G. Di; et al. Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* 2016, *6*.
34. Jack, C.R.; Albert, M.S.; Knopman, D.S.; McKhann, G.M.; Sperling, R.A.; Carrillo, M.C.; Thies, B.; Phelps, C.H. Introduction to the Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease. *Alzheimer's and Dementia* **2011**, *7*, doi:10.1016/j.jalz.2011.03.004.
35. Albert, M.S.; DeKosky, S.T.; Dickson, D.; Dubois, B.; Feldman, H.H.; Fox, N.C.; Gamst, A.; Holtzman, D.M.; Jagust, W.J.; Petersen, R.C.; et al. The Diagnosis of Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer's Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease. *Focus (Madison)* **2013**, *11*, doi:10.1176/appi.focus.11.1.96.
36. Sperling, R.A.; Aisen, P.S.; Beckett, L.A.; Bennett, D.A.; Craft, S.; Fagan, A.M.; Iwatsubo, T.; Jack, C.R.; Kaye, J.; Montine, T.J.; et al. Toward Defining the Preclinical Stages of Alzheimer's Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease. *Alzheimer's and Dementia* **2011**, *7*, doi:10.1016/j.jalz.2011.03.003.
37. Vermunt, L.; Sikkes, S.A.M.; van den Hout, A.; Handels, R.; Bos, I.; van der Flier, W.M.; Kern, S.; Ousset, P.J.; Maruff, P.; Skoog, I.; et al. Duration of Preclinical, Prodromal, and Dementia Stages of Alzheimer's Disease in Relation to Age, Sex, and APOE Genotype. *Alzheimer's and Dementia* **2019**, *15*, doi:10.1016/j.jalz.2019.04.001.
38. Knopman, D.S.; Parisi, J.E.; Salviati, A.; Floriach-Robert, M.; Boeve, B.F.; Ivnik, R.J.; Smith, G.E.; Dickson, D.W.; Johnson, K.A.; Petersen, L.E.; et al. Neuropathology of Cognitively Normal Elderly. *J Neuropathol Exp Neurol* **2003**, *62*, doi:10.1093/jnen/62.11.1087.

39. Bennett, D.A.; Schneider, J.A.; Arvanitakis, Z.; Kelly, J.F.; Aggarwal, N.T.; Shah, R.C.; Wilson, R.S. Neuropathology of Older Persons without Cognitive Impairment from Two Community-Based Studies. *Neurology* **2006**, *66*, doi:10.1212/01.wnl.0000219668.47116.e6.
40. Arboleda-Velasquez, J.F.; Lopera, F.; O'Hare, M.; Delgado-Tirado, S.; Marino, C.; Chmielewska, N.; Saez-Torres, K.L.; Amarnani, D.; Schultz, A.P.; Sperling, R.A.; et al. Resistance to Autosomal Dominant Alzheimer's Disease in an APOE3 Christchurch Homozygote: A Case Report. *Nat Med* **2019**, doi:10.1038/s41591-019-0611-3.
41. Wu, L.; Arvai, S.; Wang, S.H.J.; Liu, A.J.; Xu, B. Differential Diagnosis of Mild Cognitive Impairment of Alzheimer's Disease by Simoa p-Tau181 Measurements with Matching Plasma and CSF. *Front Mol Neurosci* **2023**, *16*, doi:10.3389/fnmol.2023.1288930.
42. Jayadev, S. Genetics of Alzheimer Disease. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology* **2022**, *28*.
43. Cacace, R.; Slegers, K.; Van Broeckhoven, C. Molecular Genetics of Early-Onset Alzheimer's Disease Revisited. *Alzheimer's and Dementia* **2016**, *12*.
44. Bateman, R.J.; Aisen, P.S.; De Strooper, B.; Fox, N.C.; Lemere, C.A.; Ringman, J.M.; Salloway, S.; Sperling, R.A.; Windisch, M.; Xiong, C. Autosomal-Dominant Alzheimer's Disease: A Review and Proposal for the Prevention of Alzheimer's Disease. *Alzheimers Res Ther* **2011**, *2*.
45. Bateman, R.J.; Xiong, C.; Benzinger, T.L.S.; Fagan, A.M.; Goate, A.; Fox, N.C.; Marcus, D.S.; Cairns, N.J.; Xie, X.; Blazey, T.M.; et al. Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* **2012**, *367*, doi:10.1056/nejmoa1202753.
46. Panza, F.; Lozupone, M.; Logroscino, G.; Imbimbo, B.P. A Critical Appraisal of Amyloid- $\beta$ -Targeting Therapies for Alzheimer Disease. *Nat Rev Neurol* **2019**, *15*.
47. O'Brien, R.J.; Wong, P.C. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* **2011**, *34*, doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613.
48. Montagna, E.; Dorostkar, M.M.; Herms, J. The Role of APP in Structural Spine Plasticity. *Front Mol Neurosci* **2017**, *10*.
49. Zhou, Z.; Chan, C.H.; Ma, Q.; Xu, X.; Xiao, Z.; Tan, E.-K. The Roles of Amyloid Precursor Protein (APP) in Neurogenesis. *Cell Adh Migr* **2011**, *5*, doi:10.4161/cam.5.4.16986.
50. Liu, X.; Liu, Y.; Ji, S. Secretases Related to Amyloid Precursor Protein Processing. *Membranes (Basel)* **2021**, *11*.
51. Roses, A.D.; Saunders, A.M. APOE Is a Major Susceptibility Gene for Alzheimer's Disease. *Curr Opin Biotechnol* **1994**, *5*, doi:10.1016/0958-1669(94)90091-4.
52. Pericak-Vance, M.A.; Bebout, J.L.; Gaskell, P.C.; Yamaoka, L.H.; Hung, W.Y.; Alberts, M.J.; Walker, A.P.; Bartlett, R.J.; Haynes, C.A.; Welsh, K.A.; et al. Linkage

- Studies in Familial Alzheimer Disease: Evidence for Chromosome 19 Linkage. *Am J Hum Genet* **1991**, *48*.
53. Van Cauwenberghe, C.; Van Broeckhoven, C.; Sleegers, K. The Genetic Landscape of Alzheimer Disease: Clinical Implications and Perspectives. *Genetics in Medicine* 2016, *18*.
54. Mahley, R.W.; Rall, S.C. Apolipoprotein E: Far More than a Lipid Transport Protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2000**, *1*, doi:10.1146/annurev.genom.1.1.507.
55. Liu, C.C.; Kanekiyo, T.; Xu, H.; Bu, G. Erratum: Apolipoprotein e and Alzheimer Disease: Risk, Mechanisms and Therapy (Nature Reviews Neurology (2013) 9 (106-118)). *Nat Rev Neurol* 2013, *9*.
56. Citron, M.; Westaway, D.; Xia, W.; Carlson, G.; Diehl, T.; Levesque, G.; Johnson-Wood, K.; Lee, M.; Seubert, P.; Davis, A.; et al. Mutant Presenilins of Alzheimer's Disease Increase Production of 42-Residue Amyloid  $\beta$ -Protein in Both Transfected Cells and Transgenic Mice. *Nat Med* **1997**, *3*, doi:10.1038/nm0197-67.
57. Tanzi, R.E. The Genetics of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, *2*, doi:10.1101/cshperspect.a006296.
58. Deture, M.A.; Dickson, D.W. The Neuropathological Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Mol Neurodegener* 2019, *14*.
59. Chakrabarti, S.; Khemka, V.K.; Banerjee, A.; Chatterjee, G.; Ganguly, A.; Biswas, A. Metabolic Risk Factors of Sporadic Alzheimer's Disease: Implications in the Pathology, Pathogenesis and Treatment. *Aging Dis* 2015, *6*.
60. Guerreiro, R.; Bras, J. The Age Factor in Alzheimer's Disease. *Genome Med* **2015**, *7*, doi:10.1186/s13073-015-0232-5.
61. Leszek, J.; Mikhaylenko, E. V.; Belousov, D.M.; Koutsouraki, E.; Szczechowiak, K.; Kobusiak-Prokopowicz, M.; Mysiak, A.; Diniz, B.S.; Somasundaram, S.G.; Kirkland, C.E.; et al. The Links between Cardiovascular Diseases and Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol* **2020**, *19*, doi:10.2174/1570159x18666200729093724.
62. Li, Y.; Li, Y.; Li, X.; Zhang, S.; Zhao, J.; Zhu, X.; Tian, G. Head Injury as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of 32 Observational Studies. *PLoS One* **2017**, *12*, doi:10.1371/journal.pone.0169650.
63. Pettigrew, C.; Soldan, A. Defining Cognitive Reserve and Implications for Cognitive Aging. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2019, *19*.
64. Raghupathi, V.; Raghupathi, W. The Influence of Education on Health: An Empirical Assessment of OECD Countries for the Period 1995-2015. *Archives of Public Health* **2020**, *78*, doi:10.1186/s13690-020-00402-5.
65. Spira, A.P.; Chen-Edinboro, L.P.; Wu, M.N.; Yaffe, K. Impact of Sleep on the Risk of Cognitive Decline and Dementia. *Curr Opin Psychiatry* 2014, *27*.

66. Saeedi, M.; Rashidy-Pour, A. Association between Chronic Stress and Alzheimer's Disease: Therapeutic Effects of Saffron. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2021, *133*.
67. Pellegrini, C.; Fornai, M.; D'Antongiovanni, V.; Antonioli, L.; Bernardini, N.; Derkinderen, P. The Intestinal Barrier in Disorders of the Central Nervous System. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2023, *8*.
68. Serrano-Pozo, A.; Frosch, M.P.; Masliah, E.; Hyman, B.T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2011**, *1*, doi:10.1101/cshperspect.a006189.
69. Hardy, J.; Selkoe, D.J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science (1979)* 2002, *297*.
70. Medina-Vera, D.; Zambrana-Infantes, E.N.; López-Gamero, A.J.; Verheul-Campos, J.; Santín, L.J.; Baixeras, E.; Suarez, J.; Pavon, F.J.; Rosell-Valle, C.; de Fonseca, F.R. Transcending the Amyloid-Beta Dominance Paradigm in Alzheimer's Disease: An Exploration of Behavioural, Metabolic, and Gut Microbiota Phenotypes in 5xFAD Mice. *Neurobiol Dis* **2023**, *187*, doi:10.1016/j.nbd.2023.106295.
71. Foley, A.R.; Roseman, G.P.; Chan, K.; Smart, A.; Finn, T.S.; Yang, K.; Scott Lokey, R.; Millhauser, G.L.; Raskatov, J.A. Evidence for Aggregation-Independent, PrPC-Mediated A $\beta$  Cellular Internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2020**, *117*, doi:10.1073/pnas.2009238117.
72. Joshi, G.; Chi, Y.; Huang, Z.; Wang, Y. A $\beta$ -Induced Golgi Fragmentation in Alzheimer's Disease Enhances A $\beta$  Production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, doi:10.1073/pnas.1320192111.
73. Sun, X.; Chen, W.D.; Wang, Y.D.  $\beta$ -Amyloid: The Key Peptide in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol* 2015, *6*.
74. Macleod, R.; Hillert, E.K.; Cameron, R.T.; Baillie, G.S. The Role and Therapeutic Targeting of  $\alpha$ -,  $\beta$ -and  $\gamma$ -Secretase in Alzheimer's Disease. *Future Sci OA* 2015, *1*.
75. Zhao, J.; Liu, X.; Xia, W.; Zhang, Y.; Wang, C. Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci* 2020, *13*.
76. Cole, S.L.; Vassar, R. The Alzheimer's Disease  $\beta$ -Secretase Enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener* **2007**, *2*, doi:10.1186/1750-1326-2-22.
77. Hur, J.Y.  $\gamma$ -Secretase in Alzheimer's Disease. *Exp Mol Med* 2022, *54*.
78. Zhang, Z.; Tian, Y.; Ye, K.  $\delta$ -Secretase in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms, Regulators and Therapeutic Opportunities. *Transl Neurodegener* 2020, *9*.
79. Willem, M.; Tahirovic, S.; Busche, M.A.; Ovsepian, S. V.; Chafai, M.; Kootar, S.; Hornburg, D.; Evans, L.D.B.; Moore, S.; Daria, A.; et al.  $\sigma$ -Secretase Processing of APP Inhibits Neuronal Activity in the Hippocampus. *Nature* **2015**, *526*, 443–447, doi:10.1038/nature14864.

80. Dunys, J.; Valverde, A.; Checler, F. Are N- And C-Terminally Truncated A  $\beta$  Species Key Pathological Triggers in Alzheimer's Disease? *Journal of Biological Chemistry* 2018, 293.
81. Kaur, P.; Khera, A.; Alajangi, H.K.; Sharma, A.; Jaiswal, P.K.; Singh, G.; Barnwal, R.P. Role of Tau in Various Tauopathies, Treatment Approaches, and Emerging Role of Nanotechnology in Neurodegenerative Disorders. *Mol Neurobiol* 2023, 60.
82. Medina-Vera, D.; Navarro, J.A.; Rivera, P.; Rosell-Valle, C.; Gutiérrez-Adán, A.; Sanjuan, C.; López-Gamero, A.J.; Tovar, R.; Suárez, J.; Pavón, F.J.; et al. D-Pinitol Promotes Tau Dephosphorylation through a Cyclin-Dependent Kinase 5 Regulation Mechanism: A New Potential Approach for Tauopathies? *Br J Pharmacol* 2022, 179, 4655–4672, doi:10.1111/bph.15907.
83. Brandt, R.; Trushina, N.I.; Bakota, L. Much More Than a Cytoskeletal Protein: Physiological and Pathological Functions of the Non-Microtubule Binding Region of Tau. *Front Neurol* 2020, 11.
84. Cherry, J.D.; Esnault, C.D.; Baucom, Z.H.; Tripodis, Y.; Huber, B.R.; Alvarez, V.E.; Stein, T.D.; Dickson, D.W.; McKee, A.C. Tau Isoforms Are Differentially Expressed across the Hippocampus in Chronic Traumatic Encephalopathy and Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol Commun* 2021, 9, doi:10.1186/s40478-021-01189-4.
85. Buée, L.; Bussièrè, T.; Buée-Scherrer, V.; Delacourte, A.; Hof, P.R. Tau Protein Isoforms, Phosphorylation and Role in Neurodegenerative Disorders. *Brain Res Rev* 2000, 33, 95–130, doi:10.1016/S0165-0173(00)00019-9.
86. Gong, C.-X.; Iqbal, K. Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease. *Curr Med Chem* 2008, 15, doi:10.2174/092986708785909111.
87. Arendt, T.; Stieler, J.T.; Holzer, M. Tau and Tauopathies. *Brain Res Bull* 2016, 126, 238–292.
88. Medina-Vera, D.; López-Gamero, A.J.; Navarro, J.A.; Sanjuan, C.; Baixeras, E.; Decara, J.; De Fonseca, F.R. Novel Insights into D-Pinitol Based Therapies: A Link between Tau Hyperphosphorylation and Insulin Resistance. *Neural Regen Res* 2024, 19.
89. Jie, C.V.M.L.; Treyer, V.; Schibli, R.; Mu, L. Tauvid™: The First FDA-Approved Pet Tracer for Imaging Tau Pathology in Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals* 2021, 14.
90. Hallinan, G.I.; Hoq, M.R.; Ghosh, M.; Vago, F.S.; Fernandez, A.; Garringer, H.J.; Vidal, R.; Jiang, W.; Ghetti, B. Structure of Tau Filaments in Prion Protein Amyloidoses. *Acta Neuropathol* 2021, 142, doi:10.1007/s00401-021-02336-w.
91. Reddy, P.H. Abnormal Tau, Mitochondrial Dysfunction, Impaired Axonal Transport of Mitochondria, and Synaptic Deprivation in Alzheimer's Disease. *Brain Res* 2011, 1415, 136–148, doi:10.1016/j.brainres.2011.07.052.

92. De Calignon, A.; Fox, L.M.; Pitstick, R.; Carlson, G.A.; Bacskai, B.J.; Spires-Jones, T.L.; Hyman, B.T. Caspase Activation Precedes and Leads to Tangles. *Nature* **2010**, *464*, doi:10.1038/nature08890.
93. Lim, S.; Haque, M.M.; Kim, D.; Kim, D.J.; Kim, Y.K. Cell-Based Models to Investigate Tau Aggregation. *Comput Struct Biotechnol J* **2014**, *12*, 7–13, doi:10.1016/j.csbj.2014.09.011.
94. Garwood, C.J.; Pooler, A.M.; Atherton, J.; Hanger, D.P.; Noble, W. Astrocytes Are Important Mediators of A $\beta$ -Induced Neurotoxicity and Tau Phosphorylation in Primary Culture. *Cell Death Dis* **2011**, *2*, doi:10.1038/cddis.2011.50.
95. Zhang, H.; Wei, W.; Zhao, M.; Ma, L.; Jiang, X.; Pei, H.; Cao, Y.; Li, H. Review Interaction between A $\beta$  and Tau in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Biol Sci* **2021**, *17*, doi:10.7150/ijbs.57078.
96. Seo, J.; Pao, P.-C.; Kritskiy, O.; Lee, A.; Patnaik, D.; Watson, L.A.; Bula, M.; Barker, S.J.; Penney, J.; Silva, M.C.; et al. A Cyclin-Dependent Kinase 5-Derived Peptide Inhibits Cdk5/P25 Activity and Improves Neurodegenerative Phenotypes. *bioRxiv* **2020**.
97. Zhang, H.; Cao, Y.; Ma, L.; Wei, Y.; Li, H. Possible Mechanisms of Tau Spread and Toxicity in Alzheimer's Disease. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*.
98. Berron, D.; Vogel, J.W.; Insel, P.S.; Pereira, J.B.; Xie, L.; Wisse, L.E.M.; Yushkevich, P.A.; Palmqvist, S.; Mattsson-Carlgrén, N.; Stomrud, E.; et al. Early Stages of Tau Pathology and Its Associations with Functional Connectivity, Atrophy and Memory. *Brain* **2021**, *144*, doi:10.1093/brain/awab114.
99. Onyango, I.G.; Jauregui, G. V.; Čarná, M.; Bennett, J.P.; Stokin, G.B. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Biomedicines* **2021**, *9*.
100. Chen, W.W.; Zhang, X.; Huang, W.J. Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases (Review). *Mol Med Rep* **2016**, *13*, doi:10.3892/mmr.2016.4948.
101. Turner, M.D.; Nedjai, B.; Hurst, T.; Pennington, D.J. Cytokines and Chemokines: At the Crossroads of Cell Signalling and Inflammatory Disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2014**, *1843*.
102. Kettenmann, H.; Verkhratsky, A. Glial Cells: Neuroglia. In *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical: Third Edition*; 2022.
103. Gu, M.; Mei, X.L.; Zhao, Y.N. Sepsis and Cerebral Dysfunction: BBB Damage, Neuroinflammation, Oxidative Stress, Apoptosis and Autophagy as Key Mediators and the Potential Therapeutic Approaches. *Neurotox Res* **2021**, *39*.
104. Heneka, M.T.; Carson, M.J.; Khoury, J. El; Landreth, G.E.; Brosseron, F.; Feinstein, D.L.; Jacobs, A.H.; Wyss-Coray, T.; Vitorica, J.; Ransohoff, R.M.; et al. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol* **2015**.
105. Pickering, M.; O'Connor, J.J. Pro-Inflammatory Cytokines and Their Effects in the Dentate Gyrus. *Prog Brain Res* **2007**, *163*.

106. Block, M.L.; Hong, J.S. Microglia and Inflammation-Mediated Neurodegeneration: Multiple Triggers with a Common Mechanism. *Prog Neurobiol* 2005, 76.
107. Lazarov, O.; Hollands, C. Hippocampal Neurogenesis: Learning to Remember. *Prog Neurobiol* 2016, 138–140.
108. Tajés, M.; Ramos-Fernández, E.; Weng-Jiang, X.; Bosch-Morató, M.; Guivernau, B.; Eraso-Pichot, A.; Salvador, B.; Fernández-Busquets, X.; Roquer, J.; Muñoz, F.J. The Blood-Brain Barrier: Structure, Function and Therapeutic Approaches to Cross It. *Mol Membr Biol* 2014, 31.
109. Coisne, C.; Engelhardt, B. Tight Junctions in Brain Barriers during Central Nervous System Inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2011, 15.
110. Zlokovic, B. V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 2008, 57.
111. Heiskala, M.; Peterson, P.A.; Yang, Y. The Roles of Claudin Superfamily Proteins in Paracellular Transport. *Traffic* 2001, 2.
112. Cockerill, I.; Oliver, J.A.; Xu, H.; Fu, B.M.; Zhu, D. Blood-Brain Barrier Integrity and Clearance of Amyloid- $\beta$  from the BBB. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; 2018; Vol. 1097.
113. Ronaldson, P.T.; Davis, T.P. Regulation of Blood–Brain Barrier Integrity by Microglia in Health and Disease: A Therapeutic Opportunity. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2020, 40.
114. Takeda, S.; Sato, N.; Ikimura, K.; Nishino, H.; Rakugi, H.; Morishita, R. Increased Blood-Brain Barrier Vulnerability to Systemic Inflammation in an Alzheimer Disease Mouse Model. *Neurobiol Aging* **2013**, 34, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.010.
115. Bennett, M.L.; Viaene, A.N. What Are Activated and Reactive Glia and What Is Their Role in Neurodegeneration? *Neurobiol Dis* 2021, 148.
116. Rodríguez-Gómez, J.A.; Kavanagh, E.; Engskog-Vlachos, P.; Engskog, M.K.R.; Herrera, A.J.; Espinosa-Oliva, A.M.; Joseph, B.; Hajji, N.; Venero, J.L.; Burguillos, M.A. Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. *Cells* 2020, 9.
117. Taipa, R.; das Neves, S.P.; Sousa, A.L.; Fernandes, J.; Pinto, C.; Correia, A.P.; Santos, E.; Pinto, P.S.; Carneiro, P.; Costa, P.; et al. Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the CSF of Patients with Alzheimer’s Disease and Their Correlation with Cognitive Decline. *Neurobiol Aging* **2019**, 76, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2018.12.019.
118. Matejuk, A.; Ransohoff, R.M. Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview. *Front Immunol* 2020, 11.
119. Sofroniew, M. V.; Vinters, H. V. Astrocytes: Biology and Pathology. *Acta Neuropathol* 2010, 119.

120. Kwon, H.S.; Koh, S.H. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders: The Roles of Microglia and Astrocytes. *Transl Neurodegener* 2020, *9*.
121. Ries, M.; Sastre, M. Mechanisms of A $\beta$  Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front Aging Neurosci* 2016, *8*.
122. Kofler, J.; Wiley, C.A. Microglia:Key Innate Immune Cells of the Brain. *Toxicol Pathol* 2011, *39*.
123. Russo, I.; Barlati, S.; Bosetti, F. Effects of Neuroinflammation on the Regenerative Capacity of Brain Stem Cells. *J Neurochem* 2011, *116*.
124. ElAli, A.; Rivest, S. Microglia in Alzheimer's Disease: A Multifaceted Relationship. *Brain Behav Immun* **2016**, *55*, doi:10.1016/j.bbi.2015.07.021.
125. Merighi, S.; Nigro, M.; Travagli, A.; Gessi, S. Microglia and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2022, *23*.
126. Shah, A.; Kishore, U.; Shastri, A. Complement System in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2021, *22*.
127. Chen, Y.; Zhou, J.; Wang, L. Role and Mechanism of Gut Microbiota in Human Disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2021, *11*.
128. Goyal, D.; Ali, S.A.; Singh, R.K. Emerging Role of Gut Microbiota in Modulation of Neuroinflammation and Neurodegeneration with Emphasis on Alzheimer's Disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2021, *106*.
129. Zhuang, Z.Q.; Shen, L.L.; Li, W.W.; Fu, X.; Zeng, F.; Gui, L.; Lü, Y.; Cai, M.; Zhu, C.; Tan, Y.L.; et al. Gut Microbiota Is Altered in Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **2018**, *63*, doi:10.3233/JAD-180176.
130. Hung, C.C.; Chang, C.C.; Huang, C.W.; Nouchi, R.; Cheng, C.H. Gut Microbiota in Patients with Alzheimer's Disease Spectrum: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Aging* **2022**, *14*, doi:10.18632/aging.203826.
131. Henry, C.J.; Huang, Y.; Wynne, A.M.; Godbout, J.P. Peripheral Lipopolysaccharide (LPS) Challenge Promotes Microglial Hyperactivity in Aged Mice That Is Associated with Exaggerated Induction of Both pro-Inflammatory IL-1 $\beta$  and Anti-Inflammatory IL-10 Cytokines. *Brain Behav Immun* **2009**, *23*, doi:10.1016/j.bbi.2008.09.002.
132. Miller, A.L.; Bessho, S.; Grando, K.; Tükel, Ç. Microbiome or Infections: Amyloid-Containing Biofilms as a Trigger for Complex Human Diseases. *Front Immunol* 2021, *12*.
133. Hou, M.; Xu, G.; Ran, M.; Luo, W.; Wang, H. APOE-E4 Carrier Status and Gut Microbiota Dysbiosis in Patients With Alzheimer Disease. *Front Neurosci* **2021**, *15*, doi:10.3389/fnins.2021.619051.
134. Zajac, D.J.; Green, S.J.; Johnson, L.A.; Estus, S. APOE Genetics Influence Murine Gut Microbiome. *Sci Rep* **2022**, *12*, doi:10.1038/s41598-022-05763-1.
135. Tran, T.T.T.; Corsini, S.; Kellingray, L.; Hegarty, C.; Le Gall, G.; Narbad, A.; Müller, M.; Tejera, N.; O'Toole, P.W.; Minihane, A.M.; et al. APOE Genotype Influences

- the Gut Microbiome Structure and Function in Humans and Mice: Relevance for Alzheimer's Disease Pathophysiology. *FASEB Journal* **2019**, *33*, doi:10.1096/fj.201900071R.
136. Razani, E.; Pourbagheri-Sigaroodi, A.; Safaroghli-Azar, A.; Zoghi, A.; Shanaki-Bavarsad, M.; Bashash, D. The PI3K/Akt Signaling Axis in Alzheimer's Disease: A Valuable Target to Stimulate or Suppress? *Cell Stress Chaperones* **2021**, *26*.
  137. Yu, H.-J.; Koh, S.-H. The Role of PI3K/AKT Pathway and Its Therapeutic Possibility in Alzheimer's Disease. *Hanyang Medical Reviews* **2017**, *37*, doi:10.7599/hmr.2017.37.1.18.
  138. Liao, H.Y.; Wang, Z. qiang; Da, C.M.; Zhou, K.S.; Zhang, H. hong Ski Regulates Proliferation and Migration of Reactive Astrocytes Induced by Lipopolysaccharide (LPS) through PI3K/Akt Pathway. *J Neuroimmunol* **2022**, *364*, doi:10.1016/j.jneuroim.2022.577807.
  139. Sánchez-Alegría, K.; Flores-León, M.; Avila-Muñoz, E.; Rodríguez-Corona, N.; Arias, C. PI3K Signaling in Neurons: A Central Node for the Control of Multiple Functions. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*.
  140. Braniste, V.; Al-Asmakh, M.; Kowal, C.; Anuar, F.; Abbaspour, A.; Tóth, M.; Korecka, A.; Bakocevic, N.; Guan, N.L.; Kundu, P.; et al. The Gut Microbiota Influences Blood-Brain Barrier Permeability in Mice. *Sci Transl Med* **2014**, *6*, doi:10.1126/scitranslmed.3009759.
  141. Banks, W.A. The Blood-Brain Barrier: Connecting the Gut and the Brain. *Regul Pept* **2008**, *149*.
  142. Doré, J.; Simrén, M.; Buttle, L.; Guarner, F. Hot Topics in Gut Microbiota. *United European Gastroenterol J* **2013**, *1*.
  143. Lee, B.; Moon, K.M.; Kim, C.Y. Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *J Immunol Res* **2018**, *2018*.
  144. Lu, Z.; Ding, L.; Lu, Q.; Chen, Y.-H. Claudins in Intestines: Distribution and Functional Significance in Health and Diseases. *Tissue Barriers* **2013**, *1*, doi:10.4161/tisb.24978.
  145. Yu, S.; Sun, Y.; Shao, X.; Zhou, Y.; Yu, Y.; Kuai, X.; Zhou, C. Leaky Gut in IBD: Intestinal Barrier–Gut Microbiota Interaction. *J Microbiol Biotechnol* **2022**, *32*.
  146. Rahman, M.S.; Hossain, K.S.; Das, S.; Kundu, S.; Adegoke, E.O.; Rahman, M.A.; Hannan, M.A.; Uddin, M.J.; Pang, M.G. Role of Insulin in Health and Disease: An Update. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*.
  147. Samuel, V.T.; Shulman, G.I. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell* **2012**, *148*.
  148. Khan, R.; Tomas, A.; Rutter, G.A. Effects on Pancreatic Beta and Other Islet Cells of the Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide. *Peptides (N.Y.)* **2020**, *125*.

149. da Silva Rosa, S.C.; Nayak, N.; Caymo, A.M.; Gordon, J.W. Mechanisms of Muscle Insulin Resistance and the Cross-Talk with Liver and Adipose Tissue. *Physiol Rep* 2020, **8**.
150. De Meyts, P. *The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network*; 2000;
151. Medina-Vera, D.; Navarro, J.A.; Tovar, R.; Rosell-Valle, C.; Gutiérrez-Adan, A.; Ledesma, J.C.; Sanjuan, C.; Pavón, F.J.; Baixeras, E.; Rodríguez de Fonseca, F.; et al. Activation of Pi3k/Akt Signaling Pathway in Rat Hypothalamus Induced by an Acute Oral Administration of d-Pinitol. *Nutrients* **2021**, *13*, doi:10.3390/nu13072268.
152. Tunduguru, R.; Thurmond, D.C. Promoting Glucose Transporter-4 Vesicle Trafficking along Cytoskeletal Tracks: PAK-Ing Them Out. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017, **8**.
153. Ruud, J.; Steculorum, S.M.; Bruning, J.C. Neuronal Control of Peripheral Insulin Sensitivity and Glucose Metabolism. *Nat Commun* 2017, **8**.
154. Galicia-Garcia, U.; Benito-Vicente, A.; Jebari, S.; Larrea-Sebal, A.; Siddiqi, H.; Uribe, K.B.; Ostolaza, H.; Martín, C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* 2020, **21**.
155. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **2014**, *37*, doi:10.2337/dc14-S081.
156. Banks, W.A.; Owen, J.B.; Erickson, M.A. Insulin in the Brain: There and Back Again. *Pharmacol Ther* 2012, **136**.
157. Blázquez, E.; Velázquez, E.; Hurtado-Carneiro, V.; Ruiz-Albusac, J.M. Insulin in the Brain: Its Pathophysiological Implications for States Related with Central Insulin Resistance, Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014, **5**.
158. Simpson, I.A.; Appel, N.M.; Hokari, M.; Oki, J.; Holman, G.D.; Maher, F.; Koehler-Stec, E.M.; Vannucci, S.J.; Smith, Q.R. Blood-Brain Barrier Glucose Transporter: Effects of Hypo- and Hyperglycemia Revisited. *J Neurochem* **1999**, *72*, doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0720238.x.
159. Pocal, A.; Lam, T.K.T.; Gutierrez-Juarez, R.; Obici, S.; Schwartz, G.J.; Bryan, J.; Aguilar-Bryan, L.; Rossetti, L. Hypothalamic KATP Channels Control Hepatic Glucose Production. *Nature* **2005**, *434*, doi:10.1038/nature03439.
160. Pomytkin, I.; Costa-Nunes, J.P.; Kasatkin, V.; Veniaminova, E.; Demchenko, A.; Lyundup, A.; Lesch, K.P.; Ponomarev, E.D.; Strekalova, T. Insulin Receptor in the Brain: Mechanisms of Activation and the Role in the CNS Pathology and Treatment. *CNS Neurosci Ther* 2018, **24**.
161. Garwood, C.J.; Ratcliffe, L.E.; Morgan, S. V.; Simpson, J.E.; Owens, H.; Vazquez-Villaseñor, I.; Heath, P.R.; Romero, I.A.; Ince, P.G.; Wharton, S.B. Insulin and IGF1 Signalling Pathways in Human Astrocytes in Vitro and in Vivo; Characterisation, Subcellular Localisation and Modulation of the Receptors. *Mol Brain* **2015**, *8*, doi:10.1186/s13041-015-0138-6.

162. De Felice, F.G. Alzheimer's Disease and Insulin Resistance: Translating Basic Science into Clinical Applications. *Journal of Clinical Investigation* **2013**, *123*, doi:10.1172/JCI64595.
163. Westwood, S.; Liu, B.; Baird, A.L.; Anand, S.; Nevado-Holgado, A.J.; Newby, D.; Pikkarainen, M.; Hallikainen, M.; Kuusisto, J.; Streffer, J.R.; et al. The Influence of Insulin Resistance on Cerebrospinal Fluid and Plasma Biomarkers of Alzheimer's Pathology. *Alzheimers Res Ther* 2017, *9*.
164. Dakic, T.; Jevdjovic, T.; Lacic, I.; Ruzicic, A.; Jasic, N.; Djurasevic, S.; Djordjevic, J.; Vujovic, P. The Expression of Insulin in the Central Nervous System: What Have We Learned So Far? *Int J Mol Sci* 2023, *24*.
165. Wang, Z.; Tang, X.; Swaminathan, S.K.; Kandimalla, K.K.; Kalari, K.R. Mapping the Dynamics of Insulin-Responsive Pathways in the Blood–Brain Barrier Endothelium Using Time-Series Transcriptomics Data. *NPJ Syst Biol Appl* **2022**, *8*, doi:10.1038/s41540-022-00235-8.
166. Spinelli, M.; Fusco, S.; Grassi, C. Brain Insulin Resistance and Hippocampal Plasticity: Mechanisms and Biomarkers of Cognitive Decline. *Front Neurosci* 2019, *10*.
167. Shahmohamady, P.; Eidi, A.; Mortazavi, P.; Panahi, N.; Minai-Tehrani, D. Effect of Sinaptic Acid on Memory Deficits and Neuronal Degeneration Induced by Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin in Rats. *Polish Journal of Pathology* **2018**, *69*, doi:10.5114/pjp.2018.79546.
168. Santos, T. de O.; Mazucanti, C.H.Y.; Xavier, G.F.; da Silva Torrão, A. Early and Late Neurodegeneration and Memory Disruption after Intracerebroventricular Streptozotocin. *Physiol Behav* **2012**, *107*, doi:10.1016/j.physbeh.2012.06.019.
169. De La Monte, S.M.; Wands, J.R. Alzheimer's Disease Is Type 3 Diabetes-Evidence Reviewed. *J Diabetes Sci Technol* 2008, *2*, 1101–1113.
170. Nguyen, T.T.; Ta, Q.T.H.; Nguyen, T.K.O.; Nguyen, T.T.D.; Giau, V. Van Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2020, *21*.
171. Ott, A.; Stolk, R.P.; Hofman, A.; Van Harskamp, F.; Grobbee, D.E.; Breteler, M.M.B. Association of Diabetes Mellitus and Dementia: The Rotterdam Study. *Diabetologia* **1996**, *39*, 1392–1397, doi:10.1007/s001250050588.
172. Ott, A.; Stolk, R.P.; Van Harskamp, F.; Pols, H.A.P.; Hofman, A.; Breteler, M.M.B. Diabetes Mellitus and the Risk of Dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* **1999**, *53*, 1937–1942, doi:10.1212/wnl.53.9.1937.
173. Baker, L.D.; Cross, D.J.; Minoshima, S.; Belongia, D.; Stennis Watson, G.; Craft, S. Insulin Resistance and Alzheimer-like Reductions in Regional Cerebral Glucose Metabolism for Cognitively Normal Adults with Prediabetes or Early Type 2 Diabetes. *Arch Neurol* **2011**, *68*, 51–57, doi:10.1001/archneurol.2010.225.
174. Steen, E.; Terry, B.M.; Rivera, E.J.; Cannon, J.L.; Neely, T.R.; Tavares, R.; Xu, X.J.; Wands, J.R.; De La Monte, S.M. Impaired Insulin and Insulin-like Growth Factor Expression and Signaling Mechanisms in Alzheimer's Disease - Is This Type 3

- Diabetes? *Journal of Alzheimer's Disease* **2005**, *7*, 63–80, doi:10.3233/JAD-2005-7107.
175. Zhao, N.; Liu, C.C.; Van Ingelgom, A.J.; Martens, Y.A.; Linares, C.; Knight, J.A.; Painter, M.M.; Sullivan, P.M.; Bu, G. Apolipoprotein E4 Impairs Neuronal Insulin Signaling by Trapping Insulin Receptor in the Endosomes. *Neuron* **2017**, *96*, doi:10.1016/j.neuron.2017.09.003.
  176. Reiman, E.M.; Chen, K.; Alexander, G.E.; Caselli, R.J.; Bandy, D.; Osborne, D.; Saunders, A.M.; Hardy, J. Correlations between Apolipoprotein E E4 Gene Dose and Brain-Imaging Measurements of Regional Hypometabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, doi:10.1073/pnas.0500579102.
  177. Bomfim, T.R.; Forny-Germano, L.; Sathler, L.B.; Brito-Moreira, J.; Houzel, J.C.; Decker, H.; Silverman, M.A.; Kazi, H.; Melo, H.M.; McClean, P.L.; et al. An Anti-Diabetes Agent Protects the Mouse Brain from Defective Insulin Signaling Caused by Alzheimer's Disease-Associated A $\beta$  Oligomers. *Journal of Clinical Investigation* **2012**, *122*, doi:10.1172/JCI57256.
  178. Pitt, J.; Thorner, M.; Brautigan, D.; Larner, J.; Klein, W.L. Protection against the Synaptic Targeting and Toxicity of Alzheimer's-Associated A $\beta$  Oligomers by Insulin Mimetic Chiro-Inositols. *FASEB Journal* **2013**, *27*, 199–207, doi:10.1096/fj.12-211896.
  179. Triani, F.; Tramutola, A.; Di Domenico, F.; Sharma, N.; Butterfield, D.A.; Head, E.; Perluigi, M.; Barone, E. Biliverdin Reductase-A Impairment Links Brain Insulin Resistance with Increased A $\beta$  Production in an Animal Model of Aging: Implications for Alzheimer Disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2018**, *1864*, doi:10.1016/j.bbadis.2018.07.005.
  180. Morelli, L.; Llovera, R.; Ibendahl, S.; Castaño, E.M. The Degradation of Amyloid  $\beta$  as a Therapeutic Strategy in Alzheimer's Disease and Cerebrovascular Amyloidoses. *Neurochem Res* **2002**, *27*.
  181. Fernandez-Gamba, A.; Leal, M.; Morelli, L.; Castano, E. Insulin-Degrading Enzyme: Structure-Function Relationship and Its Possible Roles in Health and Disease. *Curr Pharm Des* **2009**, *15*, doi:10.2174/138161209789271799.
  182. Pérez, A.; Morelli, L.; Cresto, J.C.; Castaño, E.M. Degradation of Soluble Amyloid  $\beta$ -Peptides 1-40, 1-42, and the Dutch Variant 1-40Q by Insulin Degrading Enzyme from Alzheimer Disease and Control Brains. *Neurochem Res* **2000**, *25*, doi:10.1023/A:1007527721160.
  183. Gonçalves, R.A.; Wijesekara, N.; Fraser, P.E.; De Felice, F.G. The Link between Tau and Insulin Signaling: Implications for Alzheimer's Disease and Other Tauopathies. *Front Cell Neurosci* **2019**, *13*, doi:10.3389/fncel.2019.00017.
  184. Marciniak, E.; Leboucher, A.; Caron, E.; Ahmed, T.; Tailleux, A.; Dumont, J.; Issad, T.; Gerhardt, E.; Pagesy, P.; Vileno, M.; et al. Tau Deletion Promotes Brain Insulin Resistance. *Journal of Experimental Medicine* **2017**, *214*, doi:10.1084/jem.20161731.

185. Chatterjee, S.; Ambegaokar, S.S.; Jackson, G.R.; Mudher, A. Insulin-Mediated Changes in Tau Hyperphosphorylation and Autophagy in a Drosophila Model of Tauopathy and Neuroblastoma Cells. *Front Neurosci* **2019**, *13*, doi:10.3389/fnins.2019.00801.
186. Gratuze, M.; Planel, E. Regulation of Brain Insulin Signaling: A New Function for Tau. *Journal of Experimental Medicine* **2017**, *214*, doi:10.1084/jem.20170979.
187. Shah, K.; Lahiri, D.K. Cdk5 Activity in the Brain - Multiple Paths of Regulation. *J Cell Sci* **2014**, *127*.
188. Kusakawa, G.I.; Saito, T.; Onuki, R.; Ishiguro, K.; Kishimoto, T.; Hisanaga, S.I. Calpain-Dependent Proteolytic Cleavage of the P35 Cyclin-Dependent Kinase 5 Activator to P25. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, doi:10.1074/jbc.M907757199.
189. Patrick, G.N.; Zukerberg, L.; Nikolic, M.; De La Monte, S.; Dikkes, P.; Tsai, L.H. Conversion of P35 to P25 Deregulates Cdk5 Activity and Promotes Neurodegeneration. *Nature* **1999**, *402*, doi:10.1038/45159.
190. López-Gambero, A.J.; Sanjuan, C.; Serrano-Castro, P.J.; Suárez, J.; Fonseca, F.R. De The Biomedical Uses of Inositols: A Nutraceutical Approach to Metabolic Dysfunction in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines* **2020**, *8*.
191. Billcliff, P.G.; Lowe, M. Inositol Lipid Phosphatases in Membrane Trafficking and Human Disease. *Biochemical Journal* **2014**, *461*.
192. Kinoshita, T.; Fujita, M. Thematic Review Series: Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology Biosynthesis of GPI-Anchored Proteins: Special Emphasis on GPI Lipid Remodeling. *J Lipid Res* **2016**, *57*, doi:10.1194/jlr.r063313.
193. Kinoshita, T.; Fujita, M. Biosynthesis of GPI-Anchored Proteins: Special Emphasis on GPI Lipid Remodeling. *J Lipid Res* **2016**, *57*.
194. Bourgeois, F.; Coady, M.J.; Lapointe, J.Y. Determination of Transport Stoichiometry for Two Cation-Coupled Myo-Inositol Cotransporters: SMIT2 and HMIT. *Journal of Physiology* **2005**, *563*, doi:10.1113/jphysiol.2004.076679.
195. Lin, X.; Ma, L.; Fitzgerald, R.L.; Ostlund, R.E. Human Sodium/Inositol Cotransporter 2 (SMIT2) Transports Inositols but Not Glucose in L6 Cells. *Arch Biochem Biophys* **2009**, *481*, doi:10.1016/j.abb.2008.11.008.
196. Coady, M.J.; Wallendorff, B.; Gagnon, D.G.; Lapointe, J.Y. Identification of a Novel Na<sup>+</sup>/Myo-Inositol Cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, doi:10.1074/jbc.M204321200.
197. Di Daniel, E.; Kew, J.N.; Maycox, P.R. Investigation of the H<sup>+</sup>-Myo-Inositol Transporter (HMIT) as a Neuronal Regulator of Phosphoinositide Signalling. In *Proceedings of the Biochemical Society Transactions*; 2009; Vol. 37.
198. Uldry, M.; Ibberson, M.; Horisberger, J.D.; Chatton, J.Y.; Riederer, B.M.; Thorens, B. Identification of a Mammalian H<sup>+</sup>-Myo-Inositol Symporter Expressed



- Predominantly in the Brain. *EMBO Journal* **2001**, *20*, doi:10.1093/emboj/20.16.4467.
199. Dickson, E.J.; Hille, B. Understanding Phosphoinositides: Rare, Dynamic, and Essential Membrane Phospholipids. *Biochemical Journal* **2019**, *476*.
200. Newton, A.C.; Bootman, M.D.; Scott, J. Second Messengers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2016**, *8*, doi:10.1101/cshperspect.a005926.
201. Cheng, Z.; White, M.F. The AKTion in Non-Canonical Insulin Signaling. *Nat Med* **2012**, *18*.
202. Meyts, P. De The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network Pierre. *Atlas of Diabetes* **2012**.
203. Larner, J.; Brautigan, D.L.; Thorner, M.O. D-Chiro-Inositol Glycans in Insulin Signaling and Insulin Resistance. *Molecular Medicine* **2010**, *16*, doi:10.2119/molmed.2010.00107.
204. López-Gambero, A.J.; Sanjuan, C.; Serrano-Castro, P.J.; Suárez, J.; Fonseca, F.R. De The Biomedical Uses of Inositols: A Nutraceutical Approach to Metabolic Dysfunction in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines* **2020**, *8*.
205. López-Sánchez, J.I.; Moreno, D.A.; García-Viguera, C. D-Pinitol, a Highly Valuable Product from Carob Pods: Health-Promoting Effects and Metabolic Pathways of This Natural Super-Food Ingredient and Its Derivatives. *AIMS Agriculture and Food* **2018**, *3*.
206. Larner, J.; Galasko, G.; Cheng, K.; DePaoli-Roach, A.A.; Huang, L.; Daggy, P.; Kellogg, J. Generation by Insulin of a Chemical Mediator That Controls Protein Phosphorylation and Dephosphorylation. *Science (1979)* **1979**, *206*, 1408–1410, doi:10.1126/science.228395.
207. Larner, J.; Brautigan, D.L.; Thorner, M.O. D-Chiro-Inositol Glycans in Insulin Signaling and Insulin Resistance. *Molecular Medicine* **2010**, *16*, 543–551, doi:10.2119/molmed.2010.00107.
208. Turhan, I. Relationship between Sugar Profile and D-Pinitol Content of Pods of Wild and Cultivated Types of Carob Bean (*Ceratonia Siliqua* L.). *Int J Food Prop* **2014**, *17*, doi:10.1080/10942912.2011.631255.
209. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 164619, D-Pinitol; [Cited 2023 June 28]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Pinitol>.
210. Geethan, P.K.M.A.; Prince, P.S.M. Antihyperlipidemic Effect of D-Pinitol on Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. *J Biochem Mol Toxicol* **2008**, *22*, 220–224, doi:10.1002/jbt.20218.
211. Navarro, J.A.; Decara, J.; Medina-Vera, D.; Tovar, R.; Lopez-Gambero, A.J.; Suarez, J.; Pavón, F.J.; Serrano, A.; de Ceglia, M.; Sanjuan, C.; et al. Endocrine and Metabolic Impact of Oral Ingestion of a Carob-Pod-Derived Natural-Syrup-

- Containing D-Pinitol: Potential Use as a Novel Sweetener in Diabetes. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:10.3390/pharmaceutics14081594.
212. Monastra, G.; Vazquez-Levin, M.; Bezerra Espinola, M.S.; Bilotta, G.; Laganà, A.S.; Unfer, V. D-Chiro-Inositol, an Aromatase down-Modulator, Increases Androgens and Reduces Estrogens in Male Volunteers: A Pilot Study. *Basic Clin Androl* **2021**, *31*, doi:10.1186/s12610-021-00131-x.
213. Azab, A. D-Pinitol—Active Natural Product from Carob with Notable Insulin Regulation. *Nutrients* **2022**, *14*.
214. Gao, Y.; Zhang, M.; Wu, T.; Xu, M.; Cai, H.; Zhang, Z. Effects of D-Pinitol on Insulin Resistance through the PI3K/Akt Signaling Pathway in Type 2 Diabetes Mellitus Rats. *J Agric Food Chem* **2015**, *63*, 6019–6026, doi:10.1021/acs.jafc.5b01238.
215. Müller, G.; Schulz, A.; Wied, S.; Frick, W. Regulation of Lipid Raft Proteins by Glimepiride- and Insulin-Induced Glycosylphosphatidylinositol-Specific Phospholipase C in Rat Adipocytes. *Biochem Pharmacol* **2005**, *69*, doi:10.1016/j.bcp.2004.11.014.
216. Yoshizaki, T.; Maegawa, H.; Egawa, K.; Ugi, S.; Nishio, Y.; Imamura, T.; Kobayashi, T.; Tamura, S.; Olefsky, J.M.; Kashiwagi, A. Protein Phosphatase-2C $\alpha$  as a Positive Regulator of Insulin Sensitivity through Direct Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase in 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, doi:10.1074/jbc.M313745200.
217. HIRAGA, A.; KIKUCHI, K.; TAMURA, S.; TSUIKI, S. Purification and Characterization of Mg<sup>2+</sup>-Dependent Glycogen Synthase Phosphatase (Phosphoprotein Phosphatase IA) from Rat Liver. *Eur J Biochem* **1981**, *119*, doi:10.1111/j.1432-1033.1981.tb05636.x.
218. Larner, J.; Price, J.D.; Heimark, D.; Smith, L.; Rule, G.; Piccariello, T.; Fonteles, M.C.; Pontes, C.; Vale, D.; Huang, L. Isolation, Structure, Synthesis, and Bioactivity of a Novel Putative Insulin Mediator. A Galactosamine Chiro-Inositol Pseudo-Disaccharide Mn<sup>2+</sup> Chelate with Insulin-like Activity. *J Med Chem* **2003**, *46*, doi:10.1021/jm030071j.
219. Brautigan, D.L.; Brown, M.; Grindrod, S.; Chinigo, G.; Kruszewski, A.; Lukasik, S.M.; Bushweller, J.H.; Horal, M.; Keller, S.; Tamura, S.; et al. Allosteric Activation of Protein Phosphatase 2C by D-Chiro-Inositol- Galactosamine, a Putative Mediator Mimetic of Insulin Action. *Biochemistry* **2005**, doi:10.1021/bi0508845.
220. Yadav, Y.; Dey, C.S. PP2C $\alpha$  Aggravates Neuronal Insulin Resistance Leading to AD-like Phenotype in Vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **2023**, *644*, doi:10.1016/j.bbrc.2023.01.003.
221. Yadav, Y.; Dey, C.S. PP2C $\alpha$  Positively Regulates Neuronal Insulin Signalling and Aggravates Neuronal Insulin Resistance. *FEBS Journal* **2022**, *289*, doi:10.1111/febs.16574.
222. Vasaikar, N.; Mahajan, U.; Patil, K.R.; Suchal, K.; Patil, C.R.; Ojha, S.; Goyal, S.N. D-Pinitol Attenuates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats: Impact on pro-

- Inflammatory Cytokines. *Chem Biol Interact* **2018**, *290*, doi:10.1016/j.cbi.2018.05.003.
223. Pasinetti GM. Compositions and Methods for Treating Alzheimer's Disease and Related Disorders and Promoting a Healthy Nervous System. Google Patents; 2014.
224. Navarro, J.A.; Díaz, C.; Decara, J.; Medina-Vera, D.; Lopez-Gambero, A.J.; Suarez, J.; Pavón, F.J.; Serrano, A.; Vargas, A.; Gavito, A.L.; et al. Pharmacokinetics and Endocrine Effects of an Oral Dose of D-Pinitol in Human Fasting Healthy Volunteers. *Nutrients* **2022**, *14*, doi:10.3390/nu14194094.
225. Humanetics Corporation (Responsible Party). A Single Site, Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Trial of NIC5-15 in Subjects With Alzheimer's Disease. ClinicalTrials.gov ID NCT01928420. Available from: <https://Clinicaltrials.gov/Study/NCT01928420?Term=NCT01928420&rank=1>.
226. VA Office of Research and Development. Development of NIC5-15 in the Treatment of Alzheimer's Disease. ClinicalTrials.gov ID NCT00470418. Available from: <https://Clinicaltrials.gov/Study/NCT00470418> .
227. Lee, B.H.; Lee, C.C.; Wu, S.C. Ice Plant (*Mesembryanthemum Crystallinum*) Improves Hyperglycaemia and Memory Impairments in a Wistar Rat Model of Streptozotocin-Induced Diabetes. *J Sci Food Agric* **2014**, *94*, 2266–2273, doi:10.1002/jsfa.6552.
228. Plattner, F.; Angelo, M.; Giese, K.P. The Roles of Cyclin-Dependent Kinase 5 and Glycogen Synthase Kinase 3 in Tau Hyperphosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, doi:10.1074/jbc.M603469200.
229. Noscira SA (Responsible Party). Safety, Tolerability, and Efficacy of Two Different Oral Doses of NP031112 Versus Placebo in the Treatment of Patients With Mild-to-Moderate Progressive Supranuclear Palsy (Tauros). ClinicalTrials.gov ID NCT01049399. Available from: <https://Clinicaltrials.gov/Study/NCT01049399> .
230. Allon Therapeutics (Responsible Party). Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Davunetide for the Treatment of Progressive Supranuclear Palsy. ClinicalTrials.gov ID NCT01110720. Available from: <https://Clinicaltrials.gov/Study/NCT01110720> .
231. Saido, T.C.; Sorimachi, H.; Suzuki, K. Calpain: New Perspectives in Molecular Diversity and Physiological-pathological Involvement. *The FASEB Journal* **1994**, *8*, doi:10.1096/fasebj.8.11.8070630.
232. Li, Y.; Bondada, V.; Joshi, A.; Geddes, J.W. Calpain 1 and Calpastatin Expression Is Developmentally Regulated in Rat Brain. *Exp Neurol* **2009**, *220*, doi:10.1016/j.expneurol.2009.09.004.
233. Ao, C.; Li, C.; Chen, J.; Tan, J.; Zeng, L. The Role of Cdk5 in Neurological Disorders. *Front Cell Neurosci* **2022**, *16*.
234. Wei, F.Y.; Nagashima, K.; Ohshima, T.; Saheki, Y.; Lu, Y.F.; Matsushita, M.; Yamada, Y.; Mikoshiba, K.; Seino, Y.; Matsui, H.; et al. Cdk5-Dependent

- Regulation of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Nat Med* **2005**, *11*, doi:10.1038/nm1299.
235. Ubeda, M.; Rukstalis, J.M.; Habener, J.F. Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 5 Activity Protects Pancreatic Beta Cells from Glucotoxicity. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, doi:10.1074/jbc.M604690200.
236. National Institute on Aging. NIA-Funded Active Alzheimer's and Related Dementias Clinical Trials and Studies December 2023. Available from: <https://www.nia.nih.gov/research/ongoing-ad-trials>.
237. Deardorff, W.J.; Feen, E.; Grossberg, G.T. The Use of Cholinesterase Inhibitors Across All Stages of Alzheimer's Disease. *Drugs Aging* **2015**, *32*, doi:10.1007/s40266-015-0273-x.
238. Vitek, G.E.; Decourt, B.; Sabbagh, M.N. Lecanemab (BAN2401): An Anti-Beta-Amyloid Monoclonal Antibody for the Treatment of Alzheimer Disease. *Expert Opin Investig Drugs* **2023**, *32*, doi:10.1080/13543784.2023.2178414.
239. Swanson, C.J.; Zhang, Y.; Dhadda, S.; Wang, J.; Kaplow, J.; Lai, R.Y.K.; Lannfelt, L.; Bradley, H.; Rabe, M.; Koyama, A.; et al. A Randomized, Double-Blind, Phase 2b Proof-of-Concept Clinical Trial in Early Alzheimer's Disease with Lecanemab, an Anti-A $\beta$  Protofibril Antibody. *Alzheimers Res Ther* **2021**, *13*, doi:10.1186/s13195-021-00813-8.
240. Christopher H van Dyck; Chad J Swanson; Paul Aisen; Randall J Bateman; Christopher Chen; Michelle Gee; Michio Kanekiyo; David Li; Larisa Reyderman; Sharon Cohen; et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J M* **2023**, *388(1):9-21*.
241. Planche, V.; Villain, N. US Food and Drug Administration Approval of Aducanumab - Is Amyloid Load a Valid Surrogate End Point for Alzheimer Disease Clinical Trials? *JAMA Neurol* **2021**, *78*.
242. Dhadda, S.; Kanekiyo, M.; Li, D.; Swanson, C.J.; Irizarry, M.; Berry, S.; Kramer, L.D.; Berry, D.A. Consistency of Efficacy Results across Various Clinical Measures and Statistical Methods in the Lecanemab Phase 2 Trial of Early Alzheimer's Disease. *Alzheimers Res Ther* **2022**, *14*, doi:10.1186/s13195-022-01129-x.
243. Söderberg, L.; Johannesson, M.; Nygren, P.; Laudon, H.; Eriksson, F.; Osswald, G.; Möller, C.; Lannfelt, L. Lecanemab, Aducanumab, and Gantenerumab — Binding Profiles to Different Forms of Amyloid-Beta Might Explain Efficacy and Side Effects in Clinical Trials for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* **2023**, *20*, doi:10.1007/s13311-022-01308-6.
244. Rabinovici, G.D.; La Joie, R. Amyloid-Targeting Monoclonal Antibodies for Alzheimer Disease. *JAMA* **2023**, *330*.
245. Rashad, A.; Rasool, A.; Shaheryar, M.; Sarfraz, A.; Sarfraz, Z.; Robles-Velasco, K.; Cherrez-Ojeda, I. Donanemab for Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Clinical Trials. *Healthcare (Switzerland)* **2023**, *11*, doi:10.3390/healthcare11010032.

246. Emma Taylor. New Alzheimer's Drug, Donanemab – What Is It and How Does It Work?. Alzheimer's Research UK. 04 May 2023. Available from: <https://www.alzheimersresearchuk.org/blog/new-alzheimers-drug-donanemab-what-is-it-and-how-does-it-work/> .
247. Hitt, B.D.; Gupta, A.; Singh, R.; Yang, T.; Beaver, J.D.; Shang, P.; White, C.L.; Joachimiak, L.A.; Diamond, M.I. Anti-Tau Antibodies Targeting a Conformation-Dependent Epitope Selectively Bind Seeds. *Journal of Biological Chemistry* **2023**, *299*, doi:10.1016/j.jbc.2023.105252.
248. Qureshi, I.A.; Tirucherai, G.; Ahlijanian, M.K.; Kolaitis, G.; Bechtold, C.; Grundman, M. A Randomized, Single Ascending Dose Study of Intravenous BIIB092 in Healthy Participants. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions* **2018**, *4*, doi:10.1016/j.trci.2018.10.007.
249. Shulman, M.; Rajagovindan, R.; Kong, J.; O'Gorman, J.; Viollet, L.; Huang, E.; Hering, H.; Ratti, E.; Graham, D.; Haerberlein, S.B. Top-Line Results from Tango, a Phase 2 Study of Gosuranemab in Participants with Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer's Disease and Mild Alzheimer's Disease. *Journal of prevention of alzheimer's disease* **2021**, *8*.
250. Yanamandra, K.; Jiang, H.; Mahan, T.E.; Maloney, S.E.; Wozniak, D.F.; Diamond, M.I.; Holtzman, D.M. Anti-Tau Antibody Reduces Insoluble Tau and Decreases Brain Atrophy. *Ann Clin Transl Neurol* **2015**, *2*, doi:10.1002/acn3.176.
251. Teng, E.; Manser, P.T.; Pickthorn, K.; Brunstein, F.; Blendstrup, M.; Sanabria Bohorquez, S.; Wildsmith, K.R.; Toth, B.; Dolton, M.; Ramakrishnan, V.; et al. Safety and Efficacy of Semorinamab in Individuals with Prodromal to Mild Alzheimer Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol* **2022**, *79*, doi:10.1001/jamaneurol.2022.1375.
252. Jicha, G.A.; Bowser, R.; Kazam, I.G.; Davies, P. Alz-50 and MC-1, a New Monoclonal Antibody Raised to Paired Helical Filaments, Recognize Conformational Epitopes on Recombinant Tau. *J Neurosci Res* **1997**, *48*, doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19970415)48:2<128::AID-JNR5>3.0.CO;2-E.
253. Onakpoya, I.J.; Heneghan, C.J. The Efficacy of Supplementation with the Novel Medical Food, Souvenaid, in Patients with Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Nutr Neurosci* **2017**, *20*, doi:10.1080/1028415X.2015.1110899.
254. Pasinetti, Giulio M. "Compositions and Methods for Treating Alzheimer's Disease and Related Disorders and Promoting a Healthy Nervous System." U.S. Patent No. 8,921,347. 30 Dec. 2014.
255. Sanchez-Varo, R.; Mejias-Ortega, M.; Fernandez-Valenzuela, J.J.; Nuñez-Díaz, C.; Caceres-Palomo, L.; Vegas-Gomez, L.; Sanchez-Mejias, E.; Trujillo-Estrada, L.; Garcia-Leon, J.A.; Moreno-Gonzalez, I.; et al. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: An Integrative Analysis. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*.
256. Yokoyama, M.; Kobayashi, H.; Tatsumi, L.; Tomita, T. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci* **2022**, *15*.

257. Dorszewska, J.; Predecki, M.; Oczkowska, A.; Dezor, M.; Kozubski, W. Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* **2016**, *13*, doi:10.2174/1567205013666160314150501.
258. Zhang, L.; Chen, C.; Mak, M.S.H.; Lu, J.; Wu, Z.; Chen, Q.; Han, Y.; Li, Y.; Pi, R. Advance of Sporadic Alzheimer's Disease Animal Models. *Med Res Rev* **2020**, *40*.
259. Castro-Fuentes, R.; Socas-Pérez, R. Octodon Degus: A Strong Attractor for Alzheimer Research. *Basic Clin Neurosci* **2013**, *4*.
260. Steffen, J.; Krohn, M.; Paarmann, K.; Schwitlick, C.; Brüning, T.; Marreiros, R.; Müller-Schiffmann, A.; Korth, C.; Braun, K.; Pahnke, J. Revisiting Rodent Models: Octodon Degus as Alzheimer's Disease Model? *Acta Neuropathol Commun* **2016**, *4*, doi:10.1186/s40478-016-0363-y.
261. Rosen, R.F.; Farberg, A.S.; Gearing, M.; Dooyema, J.; Long, P.M.; Anderson, D.C.; Davis-Turak, J.; Coppola, G.; Geschwind, D.H.; Paré, J.F.; et al. Tauopathy with Paired Helical Filaments in an Aged Chimpanzee. *Journal of Comparative Neurology* **2008**, *509*, doi:10.1002/cne.21744.
262. Braak, H.; Braak, E.; Strothjohann, M. Abnormally Phosphorylated Tau Protein Related to the Formation of Neurofibrillary Tangles and Neuropil Threads in the Cerebral Cortex of Sheep and Goat. *Neurosci Lett* **1994**, *171*, doi:10.1016/0304-3940(94)90589-4.
263. Head, E. A Canine Model of Human Aging and Alzheimer's Disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2013**, *1832*.
264. Alzforum. Research Models Alzheimer's Disease. Access Date: 16 Feb. 2024. Available from: <https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease> .
265. Oakley, H.; Cole, S.L.; Logan, S.; Maus, E.; Shao, P.; Craft, J.; Guillozet-Bongaarts, A.; Ohno, M.; Disterhoft, J.; Van Eldik, L.; et al. Intraneuronal  $\beta$ -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *Journal of Neuroscience* **2006**, doi:10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006.
266. Kimura, R.; Devi, L.; Ohno, M. Partial Reduction of BACE1 Improves Synaptic Plasticity, Recent and Remote Memories in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *J Neurochem* **2010**, *113*, 248–261, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06608.x.
267. Kalinin, S.; Polak, P.E.; Lin, S.X.; Sakharkar, A.J.; Pandey, S.C.; Feinstein, D.L. The Noradrenaline Precursor L-DOPS Reduces Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* **2012**, *33*, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.04.012.
268. Chu, T.H.; Cummins, K.; Sparling, J.S.; Tsutsui, S.; Brideau, C.; Nilsson, K.P.R.; Joseph, J.T.; Stys, P.K. Axonal and Myelinic Pathology in 5xFAD Alzheimer's Mouse Spinal Cord. *PLoS One* **2017**, *12*, doi:10.1371/journal.pone.0188218.

269. Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J.D.; Murphy, M.P.; Golde, T.E.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M.P.; Akbari, Y.; LaFerla, F.M. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A $\beta$  and Synaptic Dysfunction. *Neuron* **2003**, *39*, doi:10.1016/S0896-6273(03)00434-3.
270. Billings, L.M.; Oddo, S.; Green, K.N.; McGaugh, J.L.; LaFerla, F.M. Intraneuronal A $\beta$  Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice. *Neuron* **2005**, *45*, doi:10.1016/j.neuron.2005.01.040.
271. Saito, T.; Matsuba, Y.; Mihira, N.; Takano, J.; Nilsson, P.; Itohara, S.; Iwata, N.; Saido, T.C. Single App Knock-in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Nat Neurosci* **2014**, *17*, doi:10.1038/nn.3697.
272. Fernando Rodriguez De Fonseca, Juan Antonio Navarro Galera, Elena Baixeras Llanos, Juan Manuel Decara Del Olmo, Dina Medina Vera, Antonio Jesús Lopez-Gambero, Juan Suarez Perez, Carlos Sanjuan Merino Composition and Methods for Enhancing or Promoting the Secretion of Ghrelin to Promote a Healthy Metabolic Aging. Patente No. EP3789018A1, European Patent Office. Fecha de Publicación: 10.03.2021. <https://Patents.Google.Com/Patent/EP3789018A1/En>.
273. Talbot, K.; Wang, H.Y.; Kazi, H.; Han, L.Y.; Bakshi, K.P.; Stucky, A.; Fuino, R.L.; Kawaguchi, K.R.; Samoyedny, A.J.; Wilson, R.S.; et al. Demonstrated Brain Insulin Resistance in Alzheimer's Disease Patients Is Associated with IGF-1 Resistance, IRS-1 Dysregulation, and Cognitive Decline. *Journal of Clinical Investigation* **2012**, *122*, doi:10.1172/JCI59903.
274. Ferreira, L.S.S.; Fernandes, C.S.; Vieira, M.N.N.; De Felice, F.G. Insulin Resistance in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* **2018**, *12*, doi:10.3389/fnins.2018.00830.
275. Berlanga-Acosta, J.; Guillén-Nieto, G.; Rodríguez-Rodríguez, N.; Bringas-Vega, M.L.; García-del-Barco-Herrera, D.; Berlanga-Saez, J.O.; García-Ojalvo, A.; Valdés-Sosa, M.J.; Valdés-Sosa, P.A. Insulin Resistance at the Crossroad of Alzheimer Disease Pathology: A Review. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2020**, *11*.
276. Femminella, G.D.; Livingston, N.R.; Raza, S.; van der Doef, T.; Frangou, E.; Love, S.; Busza, G.; Calsolaro, V.; Carver, S.; Holmes, C.; et al. Does Insulin Resistance Influence Neurodegeneration in Non-Diabetic Alzheimer's Subjects? *Alzheimers Res Ther* **2021**, *13*, doi:10.1186/s13195-021-00784-w.
277. Sengupta, U.; Nilson, A.N.; Kaye, R. The Role of Amyloid- $\beta$  Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine* **2016**, *6*.


## 12. Anexos

### 12.1. Anexo I

Medina-Vera, Dina, et al. "Translational potential of synaptic alterations in Alzheimer's disease patients and amyloid precursor protein knock-in mice." *Brain Communications* 5.1 (2023) fcad001.

# BRAIN COMMUNICATIONS

## Translational potential of synaptic alterations in Alzheimer's disease patients and amyloid precursor protein knock-in mice

Dina Medina-Vera,<sup>1,2,3</sup> Daniela Enache,<sup>4</sup> Simone Tambaro,<sup>4</sup> Ethar Abuhashish,<sup>4</sup> Cristina Rosell-Valle,<sup>1</sup> Bengt Winblad,<sup>4,5</sup> Fernando Rodríguez de Fonseca,<sup>1</sup>  Erika Berezcki<sup>4,6,\*</sup> and Per Nilsson<sup>4,\*</sup>

\* These authors contributed equally to this work.

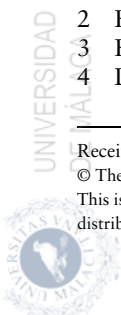
Synaptic dysfunction is an early event in Alzheimer's disease. Post-mortem studies suggest that alterations in synaptic proteins are associated with cognitive decline in Alzheimer's disease. We measured the concentration of three synaptic proteins, zinc transporter protein 3, dynamin1 and AMPA glutamate receptor 3 in cerebrospinal fluid of subjects with mild cognitive impairment ( $n = 18$ ) and Alzheimer's disease ( $n = 18$ ) and compared the levels to cognitively and neurologically healthy controls ( $n = 18$ ) by using ELISA assay. In addition, we aimed to assess the translational potential of these synaptic proteins in two established amyloid precursor protein knock-in Alzheimer's disease mouse models by assessing the cerebrospinal fluid, hippocampal and cortical synaptic protein concentrations. Using ELISA, we measured in parallel these three proteins in cerebrospinal fluid and/or brain of 12- and 24-month-old *App*<sup>NL-F</sup> and *App*<sup>NL-G-F</sup> knock-in mice and *App*<sup>WT</sup> control mice. The regional distribution and expression of these proteins were explored upon aging of the *App* knock-in models by quantitative immunofluorescence microscopy. Notably, we found a significant increase in concentrations of zinc transporter protein 3 and AMPA glutamate receptor 3 in cerebrospinal fluid of both patient groups compared with cognitively healthy controls. Dynamin1 concentration was significantly higher in Alzheimer's disease patients. Remarkably, patients with mild cognitive impairment who converted to Alzheimer's disease ( $n = 7$ ) within 2 years exhibited elevated baseline cerebrospinal fluid zinc transporter protein 3 concentrations compared with mild cognitive impairment patients who did not convert ( $n = 11$ ). Interestingly, similar to the alterations in Alzheimer's disease subjects, cerebrospinal fluid AMPA glutamate receptor 3 concentration was significantly higher in *App*<sup>NL-G-F</sup> knock-in mice when compared with wild-type controls. Furthermore, we have detected age and brain regional specific changes of the three synaptic proteins in the hippocampus and prefrontal cortex of both *App*<sup>NL-F</sup> and *App*<sup>NL-G-F</sup> knock-in mice. Notably, all the three cerebrospinal fluid synaptic protein concentrations correlated negatively with concentrations in hippocampal lysates. The elevated zinc transporter protein 3 concentrations in the cerebrospinal fluid of converter versus non-converter mild cognitive impairment patients suggests a prospective role of zinc transporter 3 in differentiating dementia patients of the biological continuum of Alzheimer's disease. The increased cerebrospinal fluid concentrations of synaptic proteins in both patient groups, potentially reflecting synaptic alterations in the brain, were similarly observed in the amyloid precursor protein knock-in mouse models highlighting the translational potential of these proteins as markers for synaptic alterations. These synaptic markers could potentially help reduce the current disparities between human and animal model-based studies aiding the translation of preclinical discoveries of pathophysiological changes into clinical research.

- 1 Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga 29010, Spain
- 2 Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga 29010, Spain
- 3 Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Málaga 29010, Spain
- 4 Department of Neurobiology, Care Sciences and Society, Center for Alzheimer Research, Division of Neurogeriatrics, Karolinska

Received February 21, 2022. Revised September 19, 2022. Accepted January 03, 2023. Advance access publication January 5, 2023

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



## 12.2. Anexo II

Medina-Vera, Dina, et al. "The Expression of the Endocannabinoid Receptors CB2 and GPR55 Is Highly Increased during the Progression of Alzheimer's Disease in AppNL-GF Knock-In Mice." *Biology* 12.6 (2023): 805.

## Article

# The Expression of the Endocannabinoid Receptors CB2 and GPR55 is Highly Increased during the Progression of Alzheimer's Disease in *App<sup>NL-G-F</sup>* Knock-In Mice

Dina Medina-Vera <sup>1,2</sup>, Hongjing Zhao <sup>3,4</sup>, Erika Berezcki <sup>4</sup>, Cristina Rosell-Valle <sup>1</sup>, Makoto Shimozawa <sup>4</sup>, Gefei Chen <sup>5</sup>, Fernando Rodríguez de Fonseca <sup>1</sup>, Per Nilsson <sup>4,†</sup> and Simone Tambaro <sup>4,\*,†</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, 29010 Málaga, Spain; dina.medina@ibima.eu (D.M.-V.); cristina.rosell@ibima.eu (C.R.-V.); fernando.rodriguez@ibima.eu (F.R.d.F.)

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain

<sup>3</sup> College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; zhaohongjing@nefu.edu.cn

<sup>4</sup> Department of Neurobiology, Care Sciences and Society, Division of Neurogeriatrics, Center for Alzheimer Research, Karolinska Institutet, 17164 Solna, Sweden; erika.berezcki@ki.se (E.B.); makoto.shimozawa@ki.se (M.S.); per.et.nilsson@ki.se (P.N.)

<sup>5</sup> Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, 14152 Huddinge, Sweden; gefei.chen@ki.se

\* Correspondence: simone.tambaro@ki.se

† These authors contributed equally to this work.

**Citation:** Medina-Vera, D.; Zhao, H.; Berezcki, E.; Rosell-Valle, C.; Shimozawa, M.; Chen, G.; de Fonseca, F.R.; Nilsson, P.; Tambaro, S. The Expression of the Endocannabinoid Receptors CB2 and GPR55 is Highly Increased during the Progression of Alzheimer's Disease in *App<sup>NL-G-F</sup>* Knock-In Mice. *Biology* **2023**, *12*, 805. <https://doi.org/10.3390/biology12060805>

Academic Editor: Annette Graham

Received: 15 March 2023

Revised: 25 May 2023

Accepted: 26 May 2023

Published: 31 May 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Alzheimer's disease (AD) is a complex, multifactorial disease where numerous components, such as environment, lifestyle, comorbidities, and genetic predisposition, contribute to triggering the onset of the disease. Several neurobiological brain alterations have been reported during AD pathologies, including the endocannabinoid system (ECS) and associated lipid transmitter-based signaling systems. In this study, we have evaluated the expression levels of the cannabinoid receptors type 2 (CB2) and the novel cannabinoid/lysophospholipid G protein-coupled receptor 55 (GPR55) at different stages of AD. We deeply investigated CB2 and GPR55's close proximity with A $\beta$ -plaque deposits, as well as neuronal and glial cells, in the AD *App<sup>NL-G-F</sup>* knock-in mouse model. Additionally, we analyzed whether A $\beta$ 42 directly affects CB2 and GPR55 protein expression in neuronal and glial primary cell cultures. Our study shows that the ECS, specifically the CB2 and GPR55 receptors, are altered during AD pathology. Monitoring these receptors may provide new biomarkers for AD diagnosis. CB2 and GPR55 could be potential pharmacological targets for selective compounds to treat AD inflammation.

**Abstract:** Background: The endocannabinoid system (ECS) and associated lipid transmitter-based signaling systems play an important role in modulating brain neuroinflammation. ECS is affected in neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease (AD). Here we have evaluated the non-psychotropic endocannabinoid receptor type 2 (CB2) and lysophosphatidylinositol G-protein-coupled receptor 55 (GPR55) localization and expression during A $\beta$ -pathology progression. Methods: Hippocampal gene expression of CB2 and GPR55 was explored by qPCR analysis, and brain distribution was evaluated by immunofluorescence in the wild type (WT) and APP knock-in *App<sup>NL-G-F</sup>* AD mouse model. Furthermore, the effects of A $\beta$ 42 on CB2 and GPR55 expression were assessed in primary cell cultures. Results: CB2 and GPR55 mRNA levels were significantly upregulated in *App<sup>NL-G-F</sup>* mice at 6 and 12 months of age, compared to WT. CB2 was highly expressed in the microglia and astrocytes surrounding the A $\beta$  plaques. Differently, GPR55 staining was mainly detected in neurons and microglia but not in astrocytes. In vitro, A $\beta$ 42 treatment enhanced CB2 receptor expression mainly in astrocytes and microglia cells, whereas GPR55 expression was enhanced primarily in neurons. Conclusions: These data show that A $\beta$  pathology progression, particularly A $\beta$ 42, plays a crucial role in increasing the expression of CB2 and GPR55 receptors, supporting CB2 and GPR55 implications in AD.

### 12.3. Anexo III

Medina-Vera, Dina, et al. "Imbalance of endocannabinoid/lysophosphatidylinositol receptors marks the severity of alzheimer's disease in a preclinical model: a therapeutic opportunity." *Biology* 9.11 (2020): 377.

Article

# Imbalance of Endocannabinoid/Lysophosphatidylinositol Receptors Marks the Severity of Alzheimer's Disease in a Preclinical Model: A Therapeutic Opportunity

Dina Medina-Vera <sup>1,2,3,\*</sup>, Cristina Rosell-Valle <sup>1,†</sup>, Antonio J. López-Gamero <sup>1,2</sup>, Juan A. Navarro <sup>1,3</sup>, Emma N. Zambrana-Infantes <sup>4</sup>, Patricia Rivera <sup>1</sup>, Luis J. Santín <sup>4</sup>, Juan Suarez <sup>1</sup> and Fernando Rodríguez de Fonseca <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, 29010 Málaga, Spain; cristina.rosell@ibima.eu (C.R.-V.); antonio.lopez@ibima.eu (A.J.L.-G.); juan\_naga@hotmail.es (J.A.N.); patricia.rivera@ibima.eu (P.R.); juan.suarez@ibima.eu (J.S.)

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain

<sup>3</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain

<sup>4</sup> Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento, Facultad de Psicología, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain; enzambrana@uma.es (E.N.Z.-I.); luis@uma.es (L.J.S.)

\* Correspondence: dina.medina@ibima.eu (D.M.-V.); fernando.rodriguez@ibima.eu (F.R.d.F.); Tel.: +34-678-233-256 (D.M.-V.); +34-669-426-548 (F.R.d.F.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 16 October 2020; Accepted: 3 November 2020; Published: 5 November 2020



**Simple Summary:** Alzheimer's disease (AD) remains a major challenge for the healthcare system worldwide and, to date, no curative treatment is available. This disease is an irreversible progressive dementia that harms memory and cognitive functions, weakening the ability to carry out tasks by themselves. Among the potential targets for developing innovative therapies for AD, the endocannabinoid system has aroused much interest in the scientific community, since it is involved in multiple processes related to AD pathology. A major challenge to understand the role of the cannabinoid system in AD is to characterize how it contributes to the expression of a specific phenotype, from neuropathology to behavior. In the present study, we addressed this challenge by evaluating the expression of the endocannabinoid system in a transgenic mouse model of AD, bearing five familial AD mutations. Our data suggest that there is an association between the cannabinoid receptors and both the cognitive function and inflammatory response characterizing the disease. Moreover, this association is aggravated by genetic factors. From these data, the expression of endocannabinoid and G protein-coupled 55 receptors (GPR55), and endocannabinoid-related enzymes might be candidate markers for the detection of the severity of this neurodegenerative disease, eventually arising as potential therapeutic targets capable of modifying the course of this incapacitating dementia.

**Abstract:** Alzheimer's disease (AD) is the most common form of neurodegeneration and dementia. The endocannabinoid (ECB) system has been proposed as a novel therapeutic target to treat AD. The present study explores the expression of the ECB system, the ECB-related receptor GPR55, and cognitive functions (novel object recognition; NOR) in the 5xFAD (FAD: family Alzheimer's disease) transgenic mouse model of AD. Experiments were performed on heterozygous (HTZ) and homozygous (HZ) 11 month old mice. Protein expression of ECB system components, neuroinflammation markers, and  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) plaques were analyzed in the hippocampus. According to the NOR test, anxiety-like behavior and memory were altered in both HTZ and HZ 5xFAD mice. Furthermore, both animal groups displayed a reduction of cannabinoid (CB1) receptor expression in the hippocampus, which is related to memory dysfunction. This finding was associated

with indirect markers of enhanced ECB production, resulting from the combination of impaired monoacylglycerol lipase (MAGL) degradation and increased diacylglycerol lipase (DAGL) levels, an effect observed in the HZ group. Regarding neuroinflammation, we observed increased levels of CB2 receptors in the HZ group that positively correlate with A $\beta$ 's accumulation. Moreover, HZ 5xFAD mice also exhibited increased expression of the GPR55 receptor. These results highlight the importance of the ECB signaling for the AD pathogenesis development beyond A $\beta$  deposition.

**Keywords:** Alzheimer's disease; 5xFAD; endocannabinoid system; amyloid- $\beta$ ; neuroinflammation; GPR55

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

