



EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DEL D-PINITOL COMO MODULADOR DE LA INSULINA: DESARROLLO DE UN NUEVO CONCEPTO DE EDULCORANTE FUNCIONAL

Juan Antonio Navarro Galera

**TESIS DOCTORAL POR
COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

Directores:

**Fernando Rodríguez de Fonseca
Elena Baixeras Llano**

Tutora:

María Isabel Lucena González

Programa de Doctorado en Biomedicina, Investigación Traslacional
y Nuevas Tecnologías en Salud

Facultad de Medicina

Universidad de Málaga, 2025



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Evaluación farmacológica del D-Pinitol como modulador de la insulina: Desarrollo de un nuevo concepto de edulcorante funcional

Pharmacological evaluation of D-Pinitol as an insulin modulator:
Development of a new concept of functional sweetener

Memoria presentada por **D. Juan Antonio Navarro Galera** para optar al grado de doctor por la Universidad de Málaga, bajo la dirección de los doctores D. Fernando Rodríguez de Fonseca y Dña. Elena Baixeras Llano

Programa de Doctorado en Biomedicina, Investigación Traslacional y
Nuevas Tecnologías en Salud

Línea de investigación en Farmacología Clínica y Experimental,
Nuevas Terapias y Tecnologías

Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

Málaga, 2025



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Juan Antonio Navarro Galera

 <https://orcid.org/0000-0003-3089-0983>

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



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

D./Dña **JUAN ANTONIO NAVARRO GALERA**

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD 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 FARMACOLÓGICA DEL D-PINITOL COMO MODULADOR DE LA INSULINA: DESARROLLO DE UN NUEVO CONCEPTO DE EDULCORANTE FUNCIONAL**

Realizada bajo la tutorización de **MARÍA ISABEL LUCENA GONZÁLEZ** y dirección de **FERNANDO RODRÍGUEZ DE FONSECA** y **ELENA BAIXERAS LLANO**

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 27 de diciembre de 2024

Fdo.: JUAN ANTONIO NAVARRO GALERA Doctorando/a	Fdo.: MARÍA ISABEL LUCENA GONZÁLEZ Tutor/a
Fdo.: FERNANDO RODRÍGUEZ DE FONSECA Director/es de tesis	y ELENA BAIXERAS LLANO



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DECLARACIÓN DE LOS DIRECTORES Y TUTORA

D. FERNANDO RODRÍGUEZ DE FONSECA,

Doctor en Medicina y Cirugía, y en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, catedrático en el Departamento de Psicobiología de la Universidad Complutense de Madrid, y director del grupo de Neuropsicofarmacología del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA) - Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (Plataforma BIONAND).

Dña. ELENA BAIXERAS LLANO,

Doctora en Ciencias Biológicas, profesora Titular de Bioquímica en el área de Bioquímica y Biología molecular del departamento de Especialidades quirúrgicas, Bioquímica e Inmunología de la Universidad de Málaga.

Dña. MARÍA ISABEL LUCENA GONZÁLEZ,

Doctora en Medicina y Cirugía, y catedrática en el Departamento de Farmacología y Pediatría de la Universidad de Málaga.

CERTIFICA/N que D. JUAN ANTONIO NAVARRO GALERA

ha obtenido y estudiado personalmente bajo mi dirección los datos clínicos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: **“EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DEL D-PINITOL COMO MODULADOR DE LA INSULINA: DESARROLLO DE UN NUEVO CONCEPTO DE EDULCORANTE FUNCIONAL”**, que considero tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.

Y que la publicación en coautoría que avala la presentación de esta tesis y cuya referencia/s es/son:

1. **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, 12, 2030; doi:10.3390/nu12072030.
2. **Juan A. Navarro**, Caridad Díaz, Juan Decara, Dina Medina-Vera, Antonio J. Lopez-Gamero, 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, 14(19), 4094. <https://doi.org/10.3390/nu14194094>.
3. **Juan A. Navarro**, Juan Decara, Dina Medina-Vera, Ruben Tovar, Antonio J. Lopez-Gamero, Juan Suarez, Francisco Javier Pavón, Antonia Serrano, Marialuisa de Ceglie, 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, 14(8), 1594. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081594>.

no han sido utilizadas en tesis anteriores ni en la Universidad de Málaga ni en otras Universidades.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en Málaga a 27 de diciembre de 2024.

Firman todos

Director/es

Director: **FERNANDO RODRÍGUEZ DE FONSECA**

Directora: **ELENA BAIXERAS LLANO**

Tutora: **MARÍA ISABEL LUCENA GONZÁLEZ**



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INFORME DE IDONEIDAD DE LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

D. FERNANDO RODRÍGUEZ DE FONSECA, doctor en Medicina y Cirugía, y en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, catedrático en el Departamento de Psicobiología de la Universidad Complutense de Madrid, y director del grupo de Neuropsicofarmacología del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA) - Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (Plataforma BIONAND); **Dña. ELENA BAIXERAS LLANO**, doctora en Ciencias Biológicas, profesora Titular de Bioquímica en el área de Bioquímica y Biología molecular del departamento de Especialidades quirúrgicas, Bioquímica e Inmunología de la Universidad de Málaga, como directores; junto con **Dña. MARÍA ISABEL LUCENA GONZÁLEZ**, doctora en Medicina y Cirugía, y catedrática en el Departamento de Farmacología y Pediatría de la Universidad de Málaga, como tutora de la tesis doctoral titulada: **“EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DEL D-PINITOL COMO MODULADOR DE LA INSULINA: DESARROLLO DE UN NUEVO CONCEPTO DE EDULCORANTE FUNCIONAL”**, y realizada por el doctorando **D. JUAN ANTONIO NAVARRO GALERA**; informan de la idoneidad de la presentación de la citada tesis en la modalidad por compendio de publicaciones, dado que cumple con todos los criterios establecidos para ello por la Universidad de Málaga. Además, certifican que las tres publicaciones científicas que avalan dicha tesis doctoral, y que se detallan a continuación, no han sido utilizadas en tesis anteriores en la Universidad de Málaga o en cualquier otra universidad.

1. **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, 12, 2030; doi:10.3390/nu12072030.
2. **Juan A. Navarro**, Caridad Díaz, Juan Decara, Dina Medina-Vera, Antonio J. Lopez-Gamero, 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, 14(19), 4094. <https://doi.org/10.3390/nu14194094>.
3. **Juan A. Navarro**, Juan Decara, Dina Medina-Vera, Ruben Tovar, Antonio J. Lopez-Gamero, Juan Suarez, Francisco Javier Pavón, Antonia Serrano, Marialuisa de Ceglie, 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, 14(8), 1594. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081594>.

Además, los coautores de dichas publicaciones aceptan la utilización de estas como parte de esta tesis doctoral y rechazan su uso en otras tesis doctorales.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Málaga, a 27 de diciembre de 2024.

Fdo.:

Fernando Rodríguez de Fonseca

Elena Baixeras Llano

María Isabel Lucena González



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Yo, Juan Antonio Navarro Galera, DECLARO que soy autor del presente trabajo y que lo he realizado en el Laboratorio de Medicina Regenerativa perteneciente al Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina (IBIMA - Plataforma BIONAND), bajo la dirección de los Dres. Fernando Rodríguez de Fonseca y Elena Baixeras Llano, y la tutorización de la Dra. María Isabel Lucena González.

Y para que así conste, firmo la presente declaración en Málaga, a 27 de diciembre de 2024.

Fdo.:

Juan Antonio Navarro Galera



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Este trabajo se ha realizado al amparo del grupo de investigación C-06-NEUROPSICOFARMACOLOGÍA, perteneciente al Instituto IBIMA - Plataforma BIONAND, área 3: Neurociencias, Cronicidad, Envejecimiento y Salud en poblaciones vulnerables y vinculado a la Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental del Hospital Regional Universitario de Málaga; que aglutina la investigación biomédica que se realiza en el ámbito hospitalario (Hospital Regional Universitario de Málaga) y académico (Universidad de Málaga).

La mayor parte del trabajo se ha desarrollado en las instalaciones del Laboratorio de Medicina Regenerativa (LMR) del Hospital Regional Universitario de Málaga. El LMR tiene como objetivo proporcionar un espacio físico y una infraestructura científica que permita desarrollar líneas de investigación biomédica. A su vez, la experimentación animal se ha llevado a cabo en el centro de Experimentación y Conducta Animal (CECA) de la Universidad de Málaga (Estructuras Comunes de Apoyo a la Investigación (ECAI) del IBIMA - Plataforma BIONAND), el cual proporciona soporte y asesoramiento científico-técnico para el mantenimiento, cría y estabulación de los animales objeto de los distintos procedimientos experimentales correspondientes a los proyectos de investigación en curso.

Con el fin de una mejor caracterización del tema de estudio, se solicitó la “Ayuda para la movilidad y perfeccionamiento del personal” perteneciente a la convocatoria 2022 del Plan propio de IBIMA - Plataforma BIONAND, para la realización de estancias de investigadores IBIMA en Centros de investigación altamente competitivos. Esta ayuda fue concedida, por lo que el doctorando pudo realizar una estancia de 3 meses (del 01/09/2022 al 01/12/2022) con fines formativos y colaborativos en el *Center for Neuroscience and Cell Biology (CNC)* de la Universidad de Coimbra (Portugal), bajo la supervisión del Profesor Dr. João Laranjinha, jefe del grupo *Redox Biology and Brain Sensing*.

Los trabajos de investigación realizados para la elaboración de la presente tesis doctoral han sido financiados por las siguientes entidades y proyectos de investigación:

- ❖ Proyecto: Diseño, ingeniería y ensamblaje de línea piloto de nuevos extractos naturales solvent free y validación in vivo de compuestos bioactivos. Investigador/a principal: Fernando Rodríguez de Fonseca. Entidad financiadora: Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Gobierno de España. Duración: 2016-2019. Referencia: RTC-2016-4983-1.
- ❖ Proyecto: Alcohol, depresión y deterioro cognitivo: Papel de las aciletanolamidas no cannabinoides. Investigador/a principal: Fernando Rodríguez de Fonseca. Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y cofinanciado por Fondos FEDER. Duración: 2020-2022. Referencia: PI19/01577.
- ❖ Proyecto: FATZHEIMER - High fat diet, microbiota and neuroinflammation in the progression of alzheimer disease. Investigador/a principal: Fernando Rodríguez de Fonseca. Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), AES 2017 dentro del Programa Europeo EU-LAC HEALTH JOINT CALL ON HEALTH RESEARCH AND INNOVATION 2017. Duración: 2018-2022. Referencia: AC17/00112.

- ❖ Proyecto: Validación preclínica de los inositoles de la algarroba sobre trastornos asociados a la resistencia insulínica. Investigador/a principal: Elena Baixeras Llano y Fernando Rodríguez de Fonseca. Entidad financiadora: Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades de la Junta de Andalucía, y cofinanciado por la Unión Europea en el marco del programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020. Duración: 2020-2022. Referencia: P18-TP-5194.
- ❖ Proyecto: Desarrollo de los inositoles D-Pinitol y D-Chiroinositol como tratamiento de enfermedades que cursan con depósito de proteína tau fosforilada (tauopatías). Investigador/a principal: Fernando Rodríguez de Fonseca. Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Duración: 2023-2024. Referencia: DTS22/00021.
- ❖ Proyecto: Obtención de principios activos antioxidantes a partir de la vaina del algarrobo y validación de su potencial terapéutico. Investigador/a principal: Fernando Rodríguez de Fonseca. Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación y Agencia Estatal de Investigación. Duración: 2020-2023. Referencia: RTC2019- 007329-1.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Hospital Regional
Universitario
de Málaga



UNIÓN EUROPEA
"Una manera de hacer Europa"





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mis padres, a mis hermanas. A Ana.

*“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo,
a dudar y a ser ignorante.”*

Miguel de Unamuno y Jugo (1864-1936).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Terminar un trabajo de la talla de una tesis doctoral e intentar reflejar en un puñado de palabras todo el agradecimiento que se debe, es, cuando menos, complicado. Así que, partiendo de la base de que no le puedo hacer justicia a tanta ayuda recibida, y que este apartado es uno de los más difíciles de redactar (no se encontró información relevante en PubMed), intentaré expresar mi más sincera gratitud a todas las personas que me han aupado hasta aquí.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores, Fernando y Elena, un dúo tan brillante como enérgico. Auténticos ejemplos de excelencia, superación y resiliencia. Dar-me la oportunidad de trabajar con vosotros ha significado mucho para mí, en lo profesional y en lo personal. Gracias por vuestra confianza, apoyo y enseñanzas. Gracias por darme un hueco en este mundillo. Sin duda sois una inspiración para muchos, y vuestro andar está haciendo camino.

También me gustaría agradecer a mi tutora, María Isabel Lucena, por prestarme su ayuda tantas veces y facilitarme tanto las cosas cuando nos encontrábamos en período de evaluación.

No puedo olvidarme del profesor João Laranjinha, que me acogió en su grupo durante mi estancia en el *Center for Neurosciences and Cell Biology* de Coimbra, ni de su equipo, Cátia Lourenço, y en especial, João Gonçalves. Muchas gracias por hacerme sentir tan cómodo y por enseñarme tanto.

Como no podía ser de otra forma, a mis compañeros del LMR. Cualquiera que haya bajado a ese laboratorio sabe que gran parte del éxito de este grupo nace del compañerismo y el entorno familiar que allí reina, cosa que hay que valorar y cuidar, pues conforme maduras te das cuenta que el buen ambiente es tan necesario como escaso. Gracias a Ana, la Gavito, pilar de este laboratorio, todo pasa por ella y sin ella estamos perdidos. Gracias a Antoñito, compañero de fatigas y cafés, pero también de alegrías y cervezas, tu destreza trabajando solo es superada por tu generosidad. Gracias a Gambero, Pepe y Miguel, es increíble como desarrolláis la excelencia en el trabajo y en el cachondeo, al mismo tiempo. Gracias a Patri, Juan Decara y Juan Suárez, me enorgullece tener una relación tan cercana con personas de vuestro calibre, os considero un ejemplo a seguir en la vida. Gracias a Marialuisa, Dina, Laura, Bea, María y Nerea, mujeres increíbles capaces de cosas increíbles, sois la prueba de que los techos están para romperlos. Gracias a Javi y Toñi, fundamentales en mantener el rumbo de este barco. Gracias a todos esos compañeros y estudiantes que han pasado por el LMR durante estos años, pues de todos he aprendido algo, pero en especial a Lourdes, Óscar, Mar e Isaac. Espero no dejarme a nadie, y si es el caso, que se me perdone, pues he coincidido con muchísima gente excepcional.

Gracias a todos mis amigos, desde Guadahortuna hasta Málaga pasando por Granada, todos habéis dejado huella en mí y habéis contribuido a la persona que soy. Manolo, Antonio, Mariano, Juanito, Martín, Juan Carlos, Inma, Adri, Nacho... Tengo suerte de que seáis muchos, y recordad que como cantó La Raíz, siempre “nos volveremos a ver”. Y gracias a Rubén, que no sé en qué categoría incluirlo, compañero, amigo o familia; a veces me mareó al echar la vista atrás y repasar todo lo que hemos vivido en más de diez años caminando juntos, hemos compartido muchos momentos, buenos y malos, espero seguir haciéndolo.

Gracias a mi familia, a los que están y a los que faltan, siempre he sentido vuestro apoyo y ayuda. Os espero en la próxima botijuela.

Llegados a este punto, se vuelve realmente difícil encontrar las palabras adecuadas para agradecer a las personas que me lo han dado todo. Mis padres. María y Juan son dos personas que nunca han tenido una vida fácil, decir que son de orígenes humildes es quedarse corto. Las circunstancias de su época, una maldita época, los obligaron a renunciar a una enseñanza decente, y con poco más que unas nociones escolares básicas, fueron empujados a duros trabajos para ayudar a sus familias. Mis padres son dos de las personas más inteligentes que conozco, lo que hace muy profunda la herida que siento en el alma cuando vislumbro el potencial perdido por culpa de la vida que les tocó. Pero igual de profundo es el orgullo que me hincha el pecho al tener presente que mis padres consiguieron para sus hijos lo que ellos nunca tuvieron, una oportunidad. A través de trabajo, sacrificio, respeto y nunca pisar a nadie, María Galera y Juan Navarro, agricultores, hoy aparecen en los agradecimientos de la tesis doctoral de su hijo. Simplemente gracias.

Y ahora, con el permiso de mis padres, a las dos personas más influyentes en mi vida. Mari Carmen e Inma, mis hermanas. Soy muy consciente de que mi viaje ha sido más sencillo gracias a que vosotras quitasteis muchas de las piedras del camino. Vuestro apoyo ha sido imprescindible para mí, sois mi ejemplo, mi guía y mi refugio. No tengo vida suficiente para agradecerlos todo lo que os debo, gracias por cuidarme, gracias por enseñarme el mundo. Os quiero.

Por último, gracias al amor de mi vida, Ana. La única persona que sabe realmente lo que este trabajo me ha supuesto. Ana no es un apoyo, ella es el andamiaje completo; sin ti, hoy no estaría escribiendo estas líneas. Me complementas, me mejoras y me haces feliz, gracias por tanto, te quiero más que a mi vida.

Este trabajo es gracias a vosotros.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	27
2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	33
3. RESUMEN.....	36
3.1. Introducción.....	37
3.2. Hipótesis	40
3.3. Objetivos	41
3.4. Metodología.....	41
3.5. Resultados y discusión.....	43
4. INTRODUCCIÓN.....	48
4.1. Insulina.....	50
4.1.1. Producción y secreción	50
4.1.2. Receptor de insulina	52
4.1.3. Función dependiente de tejido.....	54
4.1.4. Vías canónicas de señalización del receptor de la insulina.....	55
4.1.5. Finalización de la señal del receptor de la insulina.....	58
4.1.6. Resistencia a la insulina	59
4.2. Diabetes mellitus.....	61
4.2.1. Características y causas de la diabetes mellitus	61
4.2.2. Consecuencias de la diabetes mellitus	62
4.2.3. Prevalencia de la diabetes mellitus.....	64
4.2.4. Tipos de diabetes.....	65
4.2.4.1. Diabetes tipo 1	65
4.2.4.2. Diabetes tipo 2	66
4.2.4.3. Diabetes tipo 3	68
4.2.4.4. Hiperglucemia en el embarazo. Diabetes gestacional.....	70
4.2.4.5. Otros tipos de diabetes	71

4.3.	Sobrepeso y obesidad	72
4.3.1.	Causas de la obesidad.....	72
4.3.2.	Consecuencias de la obesidad	74
4.3.3.	Prevalencia de la obesidad	75
4.3.4.	Relación entre diabetes tipo 2 y obesidad.....	76
4.4.	El problema de los edulcorantes artificiales.....	76
4.5.	Inositoles.....	79
4.5.1.	Estructura	79
4.5.2.	Presencia de inositoles en organismos	80
4.5.2.1.	Obtención e incorporación de inositoles	81
4.5.3.	Propiedades fisiológicas de los inositoles y sus derivados.....	84
4.5.3.1.	Los fosfatidilinositoles (PI).....	84
4.5.3.2.	Los glicosilfosfatidilinositoles (GPI).....	87
4.5.3.3.	Los inositol fosfoglicanos (IPGs) y derivados	89
4.5.3.4.	Inositoles en la vía no canónica de señalización del receptor de la insulina	92
4.5.3.5.	Efectos insulino-miméticos directos de los inositoles y su relación con la diabetes.....	94
4.5.3.6.	Otras funciones biológicas de los inositoles.....	97
4.5.4.	Posibles usos farmacológicos de los inositoles.....	99
4.6.	D-Pinitol	100
4.6.1.	Fuentes de obtención y propiedades fisicoquímicas del D-Pinitol	101
4.6.2.	Actividad farmacológica del D-Pinitol	101
4.6.2.1.	Como antioxidante	101
4.6.2.2.	Como antiinflamatorio	102
4.6.2.3.	Como inmunosupresor.....	103
4.6.2.4.	Como anticancerígeno	104
4.6.2.5.	Como agente antiosteoporosis	105
4.6.2.6.	Como hepatoprotector	106
4.6.2.7.	Como antisenescente.....	106
4.6.2.8.	Como antidiabético	107
4.6.2.9.	Otras propiedades farmacológicas del D-Pinitol	110
4.6.3.	Retos para su uso.....	110
5.	JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	112
6.	OBJETIVOS.....	115

7. METODOLOGÍA	118
7.1. Preparación de fármacos.....	119
7.1.1. D-Pinitol	119
7.1.2. Jarabe de algarroba	119
7.1.3. Jarabe de agave	119
7.2. Estudios en ratas	119
7.2.1. Declaración ética	119
7.2.2. Animales	120
7.2.3. Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT: Glucose Tolerance Test)	120
7.2.4. Prueba de tolerancia a la insulina (ITT: Insulin Tolerance Test).....	120
7.2.5. Recolección de muestras	120
7.2.6. Medición de metabolitos y hormonas en plasma e hígado.....	121
7.2.6.1. Metabolitos plasmáticos	121
7.2.6.2. Hormonas asociadas a la homeostasis de la glucosa y citoquinas en plasma .	121
7.2.6.3. Índices HOMA.....	121
7.2.6.4. Estrés oxidativo	121
7.2.6.5. Cuerpos cetónicos.....	121
7.2.6.6. Glucógeno en hígado	121
7.2.6.7. Contenido de lípidos totales en hígado.....	122
7.2.7. Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc	122
7.2.8. qPCR en tiempo real y análisis de expresión génica	122
7.2.9. Extracción de proteínas y análisis de Western Blot	123
7.3. Estudios en humanos	125
7.3.1. Sujetos de estudio	125
7.3.2. Recolección de muestras de sangre, preparación de plasma y monitoreo de la concentración de glucosa y fructosa	127
7.3.3. Medición de concentraciones plasmáticas de metabolitos y hormonas	127
7.3.3.1. Hormonas que regulan la homeostasis de la glucosa.....	127
7.3.3.2. Ácidos grasos libres en plasma.....	127
7.3.3.3. Cuerpos cetónicos.....	128
7.3.3.4. Índice glucémico y HOMA	128
7.3.3.5. Hormonas pituitarias y gonadotropinas.....	128
7.3.3.6. Cortisol	128

7.4. Cuantificación de D-Pinitol: método de cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC/MS)	129
7.4.1. Método de espectrometría de masas.....	129
7.4.2. Validación del método para la cuantificación de D-Pinitol	129
7.4.3. Preparación de muestra	129
7.4.4. Estudio farmacocinético	130
7.5. Cultivo celular y diseño experimental <i>in vitro</i>	131
7.6. Análisis estadístico	131

8. RESULTADOS 132

8.1. Primera publicación. “D-Pinitol from *Ceratonia siliqua* is an orally active natural inositol that reduces pancreas insulin secretion and increases circulating ghrelin levels in Wistar rats” 133

8.1.1. Síntesis de resultados de la primera publicación.....	134
8.1.1.1. Análisis farmacocinético de la absorción, distribución y eliminación del D-Pinitol en plasma e hígado en un modelo de rata Wistar.....	135
8.1.1.2. Comprobación de la toxicidad de las dosis de D-Pinitol administradas en un modelo de rata Wistar	135
8.1.1.3. Impacto de la administración de D-Pinitol sobre la secreción de insulina y glucagón	135
8.1.1.4. Análisis del efecto del D-Pinitol sobre la tolerancia a glucosa e insulina en ratas Wistar	136
8.1.1.5. Impacto del D-Pinitol sobre enzimas y hormonas que regulan el metabolismo de la glucosa en ratas Wistar.....	138
8.1.1.6. Estudio del impacto del D-Pinitol en componentes de la vía de señalización del receptor de la insulina en tejido hepático	138
8.1.2. Conclusiones de resultados de la primera publicación.....	139

8.2. Segunda publicación. “Pharmacokinetics and endocrine effects of an oral dose of D-Pinitol in human fasting healthy volunteers” 139

8.2.1. Síntesis de resultados de la segunda publicación	141
8.2.1.1. Análisis farmacocinético del D-Pinitol administrado a humanos sanos en ayunas, solo o como parte de un jarabe de algarroba natural.....	141
8.2.1.2. Efectos del D-Pinitol sobre la glucosa plasmática y sus mecanismos de control en humanos sanos en ayunas	142
8.2.1.3. Efecto del D-Pinitol sobre hormonas pituitarias y cortisol en humanos sanos en ayunas	142
8.2.2. Conclusiones de resultados de la segunda publicación	143

8.3. Tercera publicación. “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” 143

8.3.1. Síntesis de resultados de la tercera publicación..... 144

8.3.1.1. Impacto de la ingesta aguda de jarabe de algarroba sobre la glucemia en humanos sanos en ayunas y cálculo de su índice glucémico..... 145

8.3.1.2. Impacto de la ingesta aguda de jarabe de algarroba sobre niveles séricos de insulina y glucagón en humanos sanos en ayunas 146

8.3.1.3. Impacto de la ingesta aguda de jarabe de algarroba sobre niveles séricos de grelina y de otras hormonas pituitarias en humanos sanos en ayunas..... 147

8.3.1.4. Impacto de la ingesta aguda de jarabe de algarroba, en humanos sanos en ayunas, sobre las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres, β -hidroxibutirato y cetonas 147

8.3.1.5. Efectos de la ingesta de jarabe de algarroba, tras administración aguda en ayunas, sobre la glucemia en un modelo de rata Wistar 147

8.3.1.6. Efectos del jarabe de algarroba sobre la glucemia tras administración crónica (oral, disuelto en la bebida) en un modelo de rata Wistar..... 148

8.3.1.7. Efectos de la administración crónica de jarabe de algarroba y de D-Pinitol puro (oral, disueltos en la bebida) sobre parámetros bioquímicos en plasma e hígado de ratas Wistar 149

8.3.1.8. Impacto de la administración crónica de jarabe de algarroba sobre la expresión génica de enzimas clave para las vías del metabolismo glucídico y lipídico en el hígado de ratas Wistar 150

8.3.1.9. Efectos de la administración crónica de jarabe de algarroba sobre proteínas clave en la señalización de la insulina en hígado, hipocampo e hipotálamo de ratas Wistar 151

8.3.2. Conclusiones de resultados de la tercera publicación..... 151

9. DISCUSIÓN 153

9.1. Estudio 1. Efectos de la administración oral aguda de D-Pinitol en un modelo de rata Wistar en ayunas (publicado en Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*) 154

9.2. Estudio 2. Farmacocinética y efectos endocrino-metabólicos del D-Pinitol, como producto aislado o como ingrediente de un jarabe natural, administrado en ayunas en un modelo humano (publicado en Navarro JA et al., 2022, *Nutrients*) 157

9.3. Estudio 3. Efectos metabólicos y endocrinos del jarabe de algarroba para su uso potencial como edulcorante natural en humanos (publicado en Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*)..... 161

9.3.1. Primera parte: efectos de la administración aguda de jarabe de algarroba en voluntarios humanos sanos en ayunas..... 161

9.3.2. Segunda parte: efectos de la administración aguda y crónica de jarabe de algarroba en ratas Wistar	163
9.4. Perspectivas de futuro.....	165
10. CONCLUSIONES FINALES	167
11. EPÍLOGO.....	169
12. ENGLISH SUMMARY AND CONCLUSIONS	171
12.1. Summary.....	172
12.1.1. Introduction.....	172
12.1.2. Hypothesis	175
12.1.3. Aims	175
12.1.4. Methodology	176
12.1.5. Results and discussion	177
12.2. Conclusions	181
12.3. Epilogue	182
13. ANEXOS	184
13.1. Listado de publicaciones que avalan esta tesis doctoral	185
13.2. Listado de otras publicaciones realizadas a lo largo de esta tesis doctoral.....	185
13.3. Listado de patentes publicadas a lo largo de esta tesis doctoral .	186
14. BIBLIOGRAFÍA.....	187



1. ABREVIATURAS

- **Acaca:** gen de la acetil-coenzima A carboxilasa 1 alfa (*Acetyl-CoA carboxylase Alpha gene*)
- **ACC:** proteína acetil-coenzima A carboxilasa (*Acetyl-CoA carboxylase protein*)
- **ACL:** enzima ATP-citrato liasa (*ATP Citrate Lyase enzyme*)
- **Acox1:** gen de la acil-coenzima A oxidasa 1 (*Acyl-CoA oxidase 1 gene*)
- **Actb:** gen de la beta actina (*beta Actin gene*)
- **ACTH:** hormona adrenocorticotrópica (*Adrenocorticotropic hormone*)
- **ADA:** asociación americana de diabetes (*The American Diabetes Association*)
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)
- **ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario (*complementary Deoxyribonucleic Acid*)
- **Akt:** también llamada PKB, proteína quinasa B (also PKB, Protein Kinase B)
- **ALT:** enzima alanina aminotransferasa (*Alanine Aminotransferase enzyme*)
- **AMPc:** Adenosín Monofosfato cíclico (*cyclic adenosine monophosphate*)
- **AMPK:** proteína quinasa activada por 5'AMP (*5' AMP-activated protein Kinase*)
- **ANOVA:** análisis de la varianza (*Analysis Of Variance*)
- **ARN:** ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)
- **ARNm:** ácido ribonucleico mensajero (*messenger Ribonucleic Acid*)
- **ARRIVE:** investigación con animales: informe de experimentos *in vivo* (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*)
- **AST:** enzima aspartato aminotransferasa (*Aspartate Aminotransferase enzyme*)
- **ATP:** adenosín trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)
- **AUC:** área bajo la curva (*Area Under the Curve*)
- **Aβ:** péptido β-amiloide (*Amyloid-β peptide*)
- **BSA:** albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)
- **CCK:** hormona colecistoquinina (*Cholecystokinin hormone*)
- **CDK5:** proteína quinasa dependiente de ciclina 5 (*Cyclin-Dependent protein Kinase 5*)
- **CDP-DAG:** citidina difosfato diacilglicerol (*Cytidine Diphosphate Diacylglycerol*)
- **Cmax:** concentración máxima (*maximum Concentration*)
- **Cox4i1:** gen de la isoforma 1 de la subunidad IV de la citocromo c oxidasa (*Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1 gene*)
- **Cox4i2:** gen de la isoforma 2 de la subunidad IV de la citocromo c oxidasa (*Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 2 gene*)
- **Cpt1a:** gen de la carnitina palmitoiltransferasa 1a (*Carnitine palmitoyltransferase 1a gene*)
- **CREB:** proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (*cAMP-Responsive Element-Binding protein*)
- **DAG:** diacilglicerol (*Diacylglycerol*)
- **DCI:** D-Chiro-inositol
- **Dieta STD (STD diet):** dieta de pellet estándar (*Standard Pellet Diet*)
- **DM:** Diabetes Mellitus
- **DP:** potencial de desagrupamiento (*Decluster Potential*)
- **DPP4:** proteína dipeptidil peptidasa 4 (*Dipeptidyl Peptidase 4 protein*)
- **DTT:** ditioneitol (*Dithiothreitol*)
- **dUTPs:** desoxiuridina trifosfatos (*deoxyuridine Triphosphates*)
- **EA (AD):** enfermedad de Alzheimer (*Alzheimer's disease*)
- **ECV (CVD):** Enfermedades Cardiovasculares (*Cardiovascular Diseases*)

- **EDTA:** ácido etilendiaminetetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
- **EI:** Epi-inositol
- **ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- **EPOC:** Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (*chronic obstructive pulmonary disease*)
- **ERK1/2:** proteína quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (*Extracellular signal- Regulated protein Kinase 1/2*)
- **FAK:** proteína quinasa de adhesión focal (*Focal Adhesion protein Kinase*)
- **Fasn:** gen de la ácido graso sintasa (*Fatty acid synthase gene*)
- **Fbp1:** gen de la fructosa-1,6-bisfosfatasa 1 (*Fructose 1,6 bisphosphatase 1 gene*)
- **FBS:** suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*)
- **FDA:** administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (*U.S. Food and Drug Administration*)
- **FFA:** ácidos grasos libres (*Free Fatty Acids*)
- **FID (IDF):** Federación Internacional de Diabetes (*The International Diabetes Federation*)
- **FIGO:** Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (*International Federation of Gynaecology and Obstetrics*)
- **FMO (WOF):** Federación Mundial de Obesidad (*World Obesity Federation*)
- **FSH:** hormona foliculoestimulante (*Follicle-Stimulating Hormone*)
- **G6P:** glucosa-6-fosfato (*Glucose-6-Phosphate*)
- **G6pc:** gen de la glucosa-6-fosfatasa subunidad catalítica (*Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene*)
- **Gapdh:** gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase gene*)
- **GDM:** diabetes mellitus gestacional (*Gestational Diabetes Mellitus*)
- **GGT:** enzima gamma-glutamyl transferasa (*Gamma-glutamyl Transferase enzyme*)
- **GH:** hormona del crecimiento (*Growth Hormone*)
- **GHRH:** hormona liberadora de la hormona del crecimiento (*Growth Hormone-Releasing Hormone*)
- **GIP:** polipéptido inhibidor gástrico (*Gastric Inhibitory Polypeptide*)
- **GLP-1:** péptido similar al glucagón tipo 1 (*Glucagon-Like Peptide 1*)
- **GLUT4:** proteína transportadora de glucosa 4 (*Glucose Transporter 4 protein*)
- **GOT:** enzima glutamato-oxalacetato transaminasa (*Glutamic Oxaloacetic Transaminase enzyme*)
- **GPI:** glicosilfosfatidilinositol (*Glycosylphosphatidylinositol*)
- **GPI-APs:** proteínas ancladas a GPI (*GPI-Anchored Proteins*)
- **GPI-PLC / PI-PLC:** enzima glicosilfosfatidilinositol fosfolipasa C (*Glycosylphosphatidylinositol Phospholipase C enzyme*)
- **GPI-PLD:** enzima glicosilfosfatidilinositol fosfolipasa D (*Glycosylphosphatidylinositol Phospholipase D enzyme*)
- **GPT:** enzima glutamato-piruvato transaminasa (*Glutamate Pyruvate Transaminase enzyme*)
- **GS:** proteína glucógeno sintasa (*Glycogen Synthase protein*)
- **GSK-3 α :** proteína glucógeno sintasa-quinasa 3 α (*Glycogen Synthase protein Kinase 3 α*)
- **GSK-3 β :** proteína glucógeno sintasa-quinasa 3 β (*Glycogen Synthase protein Kinase 3 β*)
- **GTT:** prueba de tolerancia a la glucosa (*Glucose Tolerance Test*)

- **HbA1c:** hemoglobina glicosilada (*Glycated Hemoglobin*)
- **HDL:** lipoproteína de alta densidad (*High Density Lipoprotein*)
- **HEPES:** ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid)
- **HFCS:** jarabe de maíz alto en fructosa (*High-Fructose Corn Syrup*)
- **HMIT:** transportador de myo-inositol acoplado a protones (H^+ -Myo-Inositol Transporter)
- **HOMA:** modelo de evaluación de la homeostasis (*Homeostatic Model Assessment*)
- **HOMA-IR:** modelo de evaluación de la homeostasis para la resistencia a la insulina (*Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*)
- **HOMA- β :** modelo de evaluación de la homeostasis para la actividad de células β (*Homeostasis Model Assessment of β -Cell Function*)
- **HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*)
- **HRP:** enzima peroxidasa de rábano picante (*Horseradish Peroxidase enzyme*)
- **IADPSG:** asociación internacional de grupos de estudio de diabetes y embarazo (*International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups*)
- **IDE:** enzima degradadora de la insulina (*Insulin-Degrading Enzyme*)
- **IGF-1:** proteína factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*Insulin-like Growth Factor 1 protein*)
- **IGF-1R:** proteína receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*Insulin-like Growth Factor 1 Receptor protein*)
- **IMC:** Índice de Masa Corporal (*body mass index*)
- **IMPase:** enzima inositol monofosfatasa (*Inositol Monophosphatase enzyme*)
- **Ins3P1:** myo-inositol-3-fosfato (*myo-inositol-3-phosphate*)
- **InsR:** proteína receptor de insulina (*Insulin Receptor protein*)
- **i.p.:** intraperitoneal (*intraperitoneal*)
- **IP3:** inositol 1,4,5-trisfosfato (*Inositol 1,4,5-Trisphosphate*)
- **IPG:** inositol fosfoglicano (*Inositol Phosphoglycan*)
- **IRS:** proteína sustrato del receptor de insulina (*Insulin Receptor Substrate protein*)
- **IRS-1:** proteína sustrato del receptor de insulina 1 (*Insulin Receptor Substrate 1 protein*)
- **IS:** estándar interno (*Internal Standard*)
- **ITT:** prueba de tolerancia a la insulina (*Insulin Tolerance Test*)
- **KRBH:** tampón bicarbonato de Krebs-Ringer (*Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer*)
- **LC/MS:** cromatografía líquida - espectrometría de masas (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)
- **LDL:** lipoproteína de baja densidad (*Low Density Lipoprotein*)
- **LH:** hormona luteinizante (*Luteinizing Hormone*)
- **MAPK:** proteína quinasa activada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*)
- **MDA:** malondialdehído (*Malondialdehyde*)
- **MI:** Myo-inositol
- **MIPS:** enzima myo-inositol-1-fosfato sintasa (*Myo-Inositol-1-Phosphate Synthase enzyme*)
- **MMP-9:** enzima metaloproteínasa de la matriz 9 (*Matrix Metalloproteinase 9 enzyme*)
- **MODY:** diabetes del adulto en la etapa infanto-juvenil (*Maturity Onset Diabetes of the Young*)
- **MP:** fase móvil (*Mobile Phase*)

- **MRM:** monitoreo de reacción múltiple (*Multiple Reaction Monitoring*)
- **MRT:** tiempo medio de residencia (*Mean Residence Time*)
- **mTORC1:** proteína complejo 1 de la diana de la rapamicina de los mamíferos (*mammalian Target Of Rapamycin complex 1 protein*)
- **mTORC2:** proteína complejo 2 de la diana de la rapamicina de los mamíferos (*mammalian Target Of Rapamycin complex 2 protein*)
- **MUI:** Muco-inositol
- **NASH:** esteatohepatitis no alcohólica (*Non-Alcoholic Steatohepatitis*)
- **NF-κB:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
- **NI:** Neo-inositol
- **NTDs:** defectos del tubo neural (*Neural Tube Defects*)
- **OMS (WHO):** Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*)
- **Pc:** gen de la piruvato carboxilasa (*Pyruvate carboxylase gene*)
- **Pck1:** gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 gene*)
- **PCOS:** síndrome de ovario poliquístico (*Polycystic Ovary Syndrome*)
- **PDH:** enzima piruvato deshidrogenasa (*Pyruvate Dehydrogenase enzyme*)
- **PDHP:** enzima piruvato deshidrogenasa fosfatasa (*Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase enzyme*)
- **PDK:** proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinositida (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase*)
- **PI(s):** fosfatidilinositol(es) (*Phosphatidylinositol(s)*)
- **PI3K:** enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (*Phosphatidylinositol 3-Kinase enzyme*)
- **PI(3)P:** fosfatidilinositol 3-fosfato (*Phosphatidylinositol 3-Phosphate*)
- **PI(4)P:** fosfatidilinositol 4-fosfato (*Phosphatidylinositol 4-Phosphate*)
- **PI(5)P:** fosfatidilinositol 5-fosfato (*Phosphatidylinositol 5-Phosphate*)
- **PI(3,4)P2:** fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (*Phosphatidylinositol 3,4-Bisphosphate*)
- **PI(3,5)P2:** fosfatidilinositol 3,5-bifosfato (*Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate*)
- **PI(4,5)P2 (simplificado como PIP2):** fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (*Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate*)
- **PI(3,4,5)P3 (simplificado como PIP3):** fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (*Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate*)
- **PIS:** enzima fosfatidilinositol sintasa (*Phosphatidylinositol synthase enzyme*)
- **PKA:** proteína quinasa A (*Protein Kinase A*)
- **PKC:** proteína quinasa C (*Protein Kinase C*)
- **Pklr:** gen de la piruvato quinasa (*Pyruvate kinase liver/RBC gene*)
- **PP1:** proteína fosfatasa 1 (*Protein Phosphatase 1*)
- **PP2Cα:** proteína fosfatasa 2Cα (*Protein Phosphatase 2Cα*)
- **PRL:** prolactina (*Prolactin*)
- **PTEN:** proteína homóloga de fosfatasa y tensina (*Phosphatase and Tensin Homolog Protein*)
- **PYY:** péptido tirosina tirosina (*Peptide tyrosine-tyrosine*)
- **qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)
- **RI:** Resistencia a la Insulina (*insulin resistance*)

- **RIPA:** tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (*Radioimmunoprecipitation Assay buffer*)
- **ROS:** especie reactiva de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)
- **RPMI 1640:** Medio de cultivo 1640 instituto conmemorativo de Roswell Park (*Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*)
- **Scd1:** gen de la esteroil-coenzima A desaturasa 1 (*Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 gene*)
- **SDS:** dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
- **SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
- **SEM:** error estándar de la media (*Standard Error of the Mean*)
- **Ser:** serina (*Serine*)
- **SI:** Scyllo-inositol
- **SMIT1/2:** transportadores de sodio-myo-inositol 1/2 (*Sodium-Myo-Inositol Transporters 1/2*)
- **STZ:** estreptozocina (*Streptozotocin*)
- **t1/2:** vida media en el organismo (*half-life in the body*)
- **T1DM:** diabetes mellitus tipo 1 (*Type 1 diabetes mellitus*)
- **T2DM:** diabetes mellitus tipo 2 (*Type 2 diabetes mellitus*)
- **T3DM:** diabetes mellitus tipo 3 (*Type 3 diabetes mellitus*)
- **TBARS:** sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)
- **TBS-T:** mezcla de solución salina tamponada con tris y polisorbato 20 (*mixture of tris-buffered saline solution and polysorbate 20*)
- **TFA:** ácido trifluoroacético (*Trifluoroacetic Acid*)
- **Thr:** treonina (*Threonine*)
- **Tmax:** tiempo necesario para llegar a la concentración máxima (*Time required to reach maximum concentration*)
- **TNF- α :** proteína factor de necrosis tumoral α (*Tumor Necrosis Factor α protein*)
- **Tris:** tris(hidroximetil)aminometano (*Tris(hydroxymethyl)aminomethane*)
- **TSC1/2:** proteína complejo de esclerosis tuberosa 1/2 (*Tuberous Sclerosis Complex 1/2 protein*)
- **TSH:** hormona estimulante de la tiroides (también llamada tirotropina) (*Thyroid-Stimulating Hormone*)
- **Tyr:** tirosina (*Tyrosine*)



2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras:

Figura 1. Representación simplificada del receptor de la insulina	53
Figura 2. Representación simplificada de las rutas canónicas de señalización de la insulina	57
Figura 3. Mecanismos de autorregulación de la señal de la insulina	59
Figura 4. A) Estructuras que presentan los diferentes estereoisómeros de inositol. B) Derivados metilados de inositoles	80
Figura 5. Estructura del ácido fítico	81
Figura 6. Proceso de biosíntesis de myo-inositol a partir de glucosa	82
Figura 7. Transportadores de inositoles que pueden presentar las células de mamíferos	84
Figura 8. A) Estructura del fosfatidilinositol (PI). B) Estructura de los diferentes fosfoinosítidos que pueden derivar del PI	86
Figura 9. Proceso de biosíntesis de fosfatidilinositol (PI)	86
Figura 10. Estructura de un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) unido a proteína, presente en la membrana celular	88
Figura 11. A) Formación de inositol fosfoglicanos (IPGs) a partir de anclajes GPI. B) Estructura del segundo mensajero de la insulina INS-2	90
Figura 12. Representación simplificada de la ruta no canónica de señalización de la insulina y su convergencia con la canónica	94
Figura 13. A) Cromatograma del D-Pinitol. B) Estándar interno (IS). C) Curva de calibración del D-Pinitol en muestras de plasma	130
Figura 14. Esquema del diseño experimental para el análisis de la farmacocinética y toxicidad de la administración oral de D-Pinitol en ratas Wistar en ayunas	134
Figura 15. Esquema del diseño experimental para el análisis de la secreción de insulina en cultivos de células β INS-1E en presencia de D-Pinitol	136
Figura 16. Esquema del diseño experimental del estudio para el análisis de A: GTT y B: ITT, en ratas Wistar macho en ayunas, con la administración previa de D-Pinitol	137
Figura 17. Esquema del diseño experimental para el análisis de la farmacocinética y los efectos endocrinos de la administración oral, en voluntarios humanos sanos en ayunas, de D-Pinitol puro y de jarabe de algarroba	141
Figura 18. Esquema del diseño experimental para analizar los efectos metabólicos y endocrinos de la administración oral de jarabe de algarroba en voluntarios humanos sanos en ayunas, comparándolos con los producidos por la administración de glucosa o de jarabe de agave	145

Figura 19. Esquema del diseño experimental para el análisis de los efectos de una administración aguda de jarabe de algarroba sobre la glucemia de ratas Wistar macho en ayunas 148

Figura 20. Esquema del diseño experimental para el análisis de los efectos de una administración repetida de jarabe de algarroba o D-Pinitol puro en diferentes parámetros biológicos de ratas Wistar macho 149

Tablas:

Tabla 1. Efectos más destacables de la insulina en los principales tejidos sensibles a esta hormona..... 54

Tabla 2. Composición del jarabe de algarroba (InnoSweet®)..... 119

Tabla 3. Referencias de cebadores para ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems)..... 123

Tabla 4. Referencias de anticuerpos usados en los ensayos de Western Blot..... 125

Tabla 5. Características de los voluntarios que participaron en el estudio con D-Pinitol y jarabe de algarroba..... 126

Tabla 6. Características de los voluntarios que participaron en el estudio con glucosa, jarabe de algarroba y jarabe de agave..... 126



3. RESUMEN

3.1. Introducción

Diabetes mellitus y obesidad

La diabetes y la obesidad son enfermedades que suponen un reto para los sistemas de salud de todo el mundo, ya que presentan una prevalencia realmente preocupante: en el año 2021, el 10,5% de la población mundial de entre 20 y 79 años padecía diabetes (1), mientras que el 38% (mayor de 5 años) presentaba sobrepeso u obesidad en el año 2020 (2). En este punto, por su relación, estas dos enfermedades se han convertido en pandemias interconectadas, acuñándose el término **diabesidad**.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que se caracteriza por el desarrollo de trastornos heterogéneos en el metabolismo, cuya principal consecuencia es la aparición de hiperglucemia sostenida en el tiempo, asociada a graves problemas clínicos derivados de la misma. La aparición de diabetes se puede deber a que el páncreas ya no es capaz de generar insulina (bien por destrucción de las células β de los islotes pancreáticos, secretoras de insulina, o por agotamiento de las mismas), a que el organismo es incapaz de utilizar adecuadamente esta hormona (resistencia a la insulina), o a ambas (3,4). La insulina es una hormona esencial en el metabolismo. Sintetizada por las células β , **su secreción es estimulada por la entrada de glucosa**, siendo su función fundamental la reducción de la glucemia al estimular la captación de glucosa en miocitos y adipocitos, entre otras células. Es por tanto una pieza clave en la homeostasis de la glucosa (5).

La diabetes mellitus se divide en varios tipos dependiendo de las características que presente, siendo los principales: diabetes mellitus tipo 1 (**T1DM**), tipo 2 (**T2DM**), gestacional (**GDM**), y otros tipos específicos (como la tipo 3, **T3DM**, o resistencia cerebral a la insulina). La **T2DM** es el tipo de diabetes más común, ya que la padecen más del 90% de personas con diabetes en todo el mundo (1). La T2DM es consecuencia de complejas interacciones entre el genotipo y el estilo de vida, lo que puede dar lugar a escenarios en los que las células no responden adecuadamente a la insulina debido a fallos en la señalización de su receptor, produciendo una **resistencia a la insulina (RI)** y la consecuente hiperglucemia (1,6,7). En este punto, para compensar la ineficacia de la insulina y recuperar los niveles normales de glucosa en sangre, se produce un aumento de la tasa de secreción de insulina por las células β (6). Si este estado se mantiene en el tiempo, se alcanza un punto en el que las células β se vuelven incapaces de compensar la RI al disminuir su número y función por inducirse su apoptosis. Esto se debe a la intensa respuesta de estas células a los aumentos de glucosa, con todo lo que ello conlleva: disfunción mitocondrial por estrés y gran producción de especies reactivas de oxígeno (**ROS**), que a su vez genera estrés del retículo endoplásmico, el cual empieza a producir proteínas mal plegadas (insulina) y aún más ROS. Como consecuencia de estos procesos, se genera una gran citotoxicidad, incapacidad para producir insulina, apoptosis de la célula β y destrucción de los islotes de Langerhans, en definitiva, lo que se denomina como **“agotamiento del páncreas”** (8). A medida que la disfunción de las células β y la resistencia a la insulina se exacerban, la hiperglucemia se amplifica, lo que conduce inexorablemente al desarrollo de **T2DM** (1,6,7,9).

Una alta concentración de glucosa circulante de forma continuada trae consigo un incremento de los procesos oxidativos con efectos nefastos en varios órganos, especialmente en su microcirculación, generando patología diabética renal, retiniana, cardíaca etc. Esto hace que la consecuencia principal asociada a la diabetes sea el aumento del **estrés oxidativo**, involucrado tanto en la patogénesis de la enfermedad como en sus complicaciones a largo plazo.

Para desarrollar T2DM, el factor de riesgo individual más importante es el exceso de grasa en el organismo (10,11), que se asocia con varias anormalidades metabólicas que resultan en resistencia a la insulina (12); por lo que el **sobrepeso** y la **obesidad** presentan un fuerte vínculo con la aparición de T2DM (1,10). La obesidad es una enfermedad multifactorial crónica que se caracteriza por una excesiva acumulación de depósitos de grasa; es causada por una interacción entre factores ambientales y predisposición genética que lleva a un balance energético positivo en el que la ingesta de calorías supera el gasto (13).

La relación entre obesidad y diabetes es compleja y no solo se reduce a que la obesidad es un importante factor de riesgo para la aparición de T2DM, sino que también puede darse que la **T2DM produzca obesidad**. Las personas que están genéticamente predispuestas a desarrollar diabetes tienen un alto riesgo de padecer obesidad debido a una mayor producción y almacenamiento de grasa (14).

El problema de los edulcorantes artificiales

Uno de los factores fundamentales que promueven la obesidad y la T2DM es la ingesta excesiva de hidratos de carbono, ya que el sabor dulce de los mismos refuerza su ingesta y, a la vez, sobrecarga al páncreas. Por eso, la aparición de alimentos procesados edulcorados con azúcares añadidos (p. ej. jarabe de maíz alto en fructosa) supuso un incremento en la prevalencia de enfermedades como la obesidad y la T2DM. Como alternativa a los azúcares naturales usados como endulzantes, surgieron los edulcorantes artificiales (acesulfamo de potasio, aspartamo, neotame, sacarina, etc.), ya que son sustancias con muy poco o ningún aporte calórico, pero con un dulzor mucho mayor (15). Con estas características, los edulcorantes artificiales se han convertido en populares sustitutos del azúcar de mesa, y se ha incrementado su uso. Sin embargo, cada vez aparecen más autores y estudios que muestran que su consumo rápido y generalizado entre la población no se ha visto acompañado por una notable reducción en el problema de la diabetes (16–18). A esto hay que añadir la creciente controversia sobre la seguridad de estas sustancias, ya que posiblemente su consumo excesivo y prolongado tenga consecuencias no deseadas sobre la salud (19–22). Existen indicios de una posible asociación directa entre un mayor consumo de edulcorantes artificiales y un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, hipertensión, inflamación/disfunción vascular o disbiosis de la microbiota (23–30).

Ante este escenario, en este trabajo se plantea el estudio de suplementos alimenticios que mejoren el metabolismo que el propio organismo hace de los carbohidratos. La estrategia se basa en incorporar **ingredientes naturales funcionales** a formulaciones alimenticias, que mantengan su palatabilidad, pero que ayuden al cuerpo a llevar a cabo un correcto procesamiento de los azúcares y eviten la excesiva transformación de estos en grasa, normalizando además el estrés oxidativo. Los inositoles, y en concreto el D-Pinitol, son sustancias naturales que, debido a sus propiedades, podrían ser consideradas como estos ingredientes activos para preparaciones de endulzantes saludables.

Inositoles

Los inositoles son compuestos orgánicos similares a los monosacáridos, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y presentan una estructura cíclica de seis carbonos y seis alcoholes, por esto se clasifican como alcoholes de azúcar (polioles con un grupo hidroxilo unido a cada átomo de carbono). Además, tanto los inositoles como los derivados metilados de estos también son clasificados como ciclitales (cicloalcanos que contienen al menos tres grupos hidroxilo, cada uno unido a un átomo de carbono diferente del anillo) (31).

Según su estructura, en la naturaleza se pueden encontrar ocho estereoisómeros de inositol: myo-, scyllo-, muco-, epi-, neo-, allo-, D-chiro- y L-chiro-inositol. Muchos extractos de

plantas también contienen **derivados metilados** de inositoles, como el **D-Pinitol** (31). Los diferentes estereoisómeros de inositol se encuentran en concentraciones variables en tejidos de diversas plantas (32). En cambio, el **myo-inositol (MI)**, el **scyllo-inositol (SI)**, y el **D-chiro-inositol (DCI)** se han detectado como los principales inositoles presentes en bacterias y en los tejidos de mamíferos (31).

Ya que los inositoles son muy abundantes en la membrana celular de plantas y animales, se pueden obtener fácilmente a través de la dieta (33,34). La forma más común de incorporación de inositol es el MI libre o en forma de **ácido fítico**, siendo las plantas las principales fuentes. Otro inositol que se incorpora a través de la dieta es el DCI, pero principalmente se obtiene a partir de su forma metilada (**D-Pinitol**), ya que sufre un proceso de desmetilación en el tracto gastrointestinal debido a las condiciones generadas por las secreciones ácidas del estómago.

Los inositoles por sí mismos juegan un rol imprescindible en el organismo, actúan como osmolitos, intervienen en diferentes vías de señalización, o participan en la endocitosis/exocitosis vesicular (35). Pero su función la realizan fundamentalmente como constituyentes esenciales de fosfolípidos complejos de la membrana plasmática: **fosfatidilinositoles (PI)**, **glicosilfosfatidilinositoles (GPI)** e **inositol fosfoglicanos (IPGs) y derivados**; estos, además de su función estructural, participan en rutas metabólicas como segundos mensajeros.

Cabe destacar que los inositoles también juegan un papel importante en la **vía no canónica de señalización del receptor de la insulina**, esta hace referencia a las respuestas celulares mediadas por el receptor de la insulina al unirse a su ligando, y que implican la activación de una cascada de eventos intracelulares alternativa a las vías clásicas conocidas. Se han propuesto varias vías diferentes a las canónicas, pero una de ellas conduce a la formación de **IPGs y derivados**, que intervienen o se incorporan a la vía clásica de señalización de la insulina (36), actuando como segundos mensajeros putativos.

La participación de los inositoles en las vías de señalización de la insulina, ha llevado al desarrollo de estudios que muestran un efecto directo de la administración de inositoles sobre agentes clave de estas rutas (31), dejando patente su actuación como sensibilizadores o incluso miméticos de los efectos de la insulina, aunque se desconoce el mecanismo exacto a través del cual actúan. Gracias a las propiedades insulino-miméticas de los inositoles (y derivados), la administración de estos compuestos ha demostrado ser eficaz para frenar la resistencia a la insulina y reducir la glucemia posprandial, así como los trastornos asociados a la hiperglucemia (37). Sin embargo, la existencia de estudios que muestran una disparidad de resultados derivados de la administración de inositoles (38,39), pone de manifiesto que el efecto de la suplementación con estos compuestos puede variar dependiendo de diversos factores, algunos aún desconocidos (40). Por lo que, en este trabajo se intenta describir con más detalle la farmacocinética y efectos que produce un inositol en concreto: el D-Pinitol, ya sea administrado en solitario, o formando parte de un jarabe compuesto principalmente de glucosa y fructosa.

D-Pinitol

El D-Pinitol (3-O-metil-D-chiro-inositol, derivado metilado del DCI) está presente de forma natural en multitud de plantas, siendo especialmente abundante en el género *Pinus*, en las hojas de *Bougainvillea spectabilis*, y en la familia de las leguminosas (como en la planta de soja, *Glycine max*, o en las vainas del algarrobo, *Ceratonia siliqua*) (41–44). Concretamente a partir del algarrobo, una especie nativa y muy extendida en la cuenca del mediterráneo, se puede llevar a cabo el aislamiento y producción industrial de D-Pinitol.

Las plantas ricas en D-Pinitol se han usado en la medicina tradicional como tratamiento empírico de diferentes alteraciones, como diabetes, inflamaciones, cáncer o infecciones (41). En la actualidad se conoce que este inositol tiene un potencial farmacológico mucho mayor, ya que presenta efectos beneficiosos en un amplio espectro de procesos biológicos, entre los que destaca su papel como: **antioxidante, antiinflamatorio, inmunosupresor, anticancerígeno, agente antiosteoporosis, hepatoprotector, antisenescente**, y principalmente **antidiabético**.

Múltiples estudios muestran el potencial del D-Pinitol como fármaco para el tratamiento de la diabetes, primero por su capacidad para reducir los niveles de glucosa en sangre, y segundo, por sus efectos positivos sobre otras complicaciones metabólicas asociadas a esta enfermedad (mejora en los perfiles lipídicos, atenuación del estrés oxidativo, disminución de factores proinflamatorios, o protección de los tejidos hepático, renal y pancreático) (45–48). Pero es importante tener presente que aún quedan incógnitas que desentrañar sobre sus mecanismos de acción, ya que existen investigaciones en donde no se encontró un efecto beneficioso del D-Pinitol sobre la glucemia o la sensibilidad a la insulina (49–51).

3.2. Hipótesis

Por todo lo descrito, con este trabajo de tesis doctoral se pretende estudiar los efectos de la administración de D-Pinitol (en solitario y en conjunto con azúcares) en humanos y en un modelo animal de rata, en relación a determinadas acciones metabólicas desencadenadas y desconocidas hasta el momento. Por lo que se plantea la siguiente **hipótesis general**:

“La administración oral del compuesto natural D-Pinitol es segura a corto y largo plazo; es de rápida absorción y distribución en plasma e hígado, además es capaz de modular las acciones de la insulina dependiendo del estadio del ciclo ayuno/alimentación, lo que influye en la secreción de la propia insulina y de otras hormonas implicadas en la homeostasis de la glucosa, logrando así un impacto beneficioso tanto en el metabolismo glucídico como en el lipídico”.

Por otro lado, uno de los principales desafíos en la lucha actual contra las epidemias de obesidad y T2DM es lograr un consumo nutricionalmente correcto de hidratos de carbono en la dieta, tanto en cantidad, como en calidad, que minimice el riesgo de sufrir trastornos metabólicos. Ante esto, el objetivo es consumir alimentos que contengan endulzantes naturales que, conservando las propiedades palatables, logren mantener un equilibrio metabólico saludable. Esto se puede conseguir mediante el consumo de “alimentos funcionales”, entendiendo como tales aquellos que además de su valor nutritivo, contienen componentes biológicamente activos que aportan algún efecto “farmacológico” añadido beneficioso para la salud y que reducen el riesgo de contraer ciertas enfermedades. En este punto, el D-Pinitol, por sus efectos anteriormente descritos, debe ser considerado como un ingrediente activo y funcional para preparaciones de “endulzantes saludables”. Por lo que en este trabajo se estudió los efectos del consumo de un jarabe de algarroba constituido principalmente por glucosa y fructosa, pero presentando D-Pinitol en su composición, y se propone la siguiente **hipótesis secundaria**:

“El jarabe de algarroba, gracias a la presencia de D-Pinitol en su composición, manteniendo la palatabilidad y capacidad endulzante naturales proporcionadas por su contenido de glucosa y fructosa, presenta a la vez la ventaja de tener un índice glucémico mejor que el de estos monosacáridos administrados aisladamente. Además, por sus acciones farmacológicas, puede mejorar el metabolismo de carbohidratos y de lípidos, lo que lo convierte en un alimento funcional utilizable como endulzante alternativo de consumo bioseguro”.

3.3. Objetivos

En base a las hipótesis enunciadas, se plantean cinco objetivos generales:

- **Objetivo 1.** Caracterizar la farmacocinética del D-Pinitol y comprobar la posible toxicidad tras su administración en ayunas en un modelo *in vivo* (rata), para posteriormente evaluar su impacto sobre el metabolismo glucídico y sobre las hormonas que lo regulan.
- **Objetivo 2.** Caracterizar en voluntarios humanos sanos en ayunas la farmacocinética y efectos endocrinos de la administración oral de D-Pinitol puro o como componente de un jarabe de algarroba natural.
- **Objetivo 3.** Evaluar los efectos de la administración oral aguda de jarabe de algarroba sobre aspectos que controlan y se relacionan con la función metabólica de la insulina, para su consideración como endulzante natural en humanos obesos y/o diabéticos.
- **Objetivo 4.** Evaluar los efectos de la administración crónica de jarabe de algarroba (administrado en el agua de la bebida) sobre aspectos que controlan y se relacionan con la función metabólica de la insulina en plasma y tejido hepático de ratas Wistar, mantenidas bajo una dieta normal.
- **Objetivo 5.** Evaluar los efectos de la administración crónica de jarabe de algarroba (administrado en el agua de la bebida) sobre aspectos que controlan y se relacionan con la función de la insulina en hipotálamo e hipocampo de ratas Wistar, mantenidas bajo una dieta normal.

3.4. Metodología

Para dar respuesta a los diferentes objetivos propuestos, la metodología seguida durante el trabajo de experimentación se resume a continuación.

Estudios en ratas

Los experimentos se realizaron con ratas Wistar macho de 4 a 5 meses de edad (CrI:WI(Han)) con un peso de 400 ± 20 g. Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales estándar, se alimentaron con una dieta de pellet estándar y disponían de agua y comida *ad libitum*.

Para los estudios agudos, los animales se mantuvieron en ayunas durante 18 horas, después, para uno de los experimentos, se les administró por vía oral D-Pinitol disuelto en agua, en una concentración de 100 mg/kg o 500 mg/kg; tras la administración se sacrificaron los animales a diferentes tiempos y se recogieron muestras para posteriores análisis. Para otro de los experimentos se administró a un grupo de animales una dosis de 2 g/Kg de glucosa diluida en agua (vía oral), y a otro grupo, una dosis de jarabe de algarroba de 4,38 g/Kg (contenido en glucosa de 2 g/Kg), también vía oral; tras la administración se monitorizó los niveles de glucosa en sangre a diferentes tiempos.

Para el estudio crónico, durante 10 días se administró a los animales con D-Pinitol (100 mg/Kg/día), o con jarabe de algarroba (dosis ajustada a una cantidad diaria de 100 mg/Kg de D-Pinitol), ambos compuestos disueltos en la bebida; tras este tiempo se sacrificaron los animales y se recogieron muestras para posteriores análisis.

Por otro lado, para testar el efecto del D-Pinitol sobre la glucemia, algunos animales se trataron con una dosis de 100 mg/Kg de D-Pinitol (oral) a diferentes tiempos antes de una

inyección de glucosa o de insulina, para la posterior realización de una prueba de tolerancia a la glucosa o una prueba de tolerancia a la insulina respectivamente.

Las muestras recogidas tras los diferentes experimentos se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento y posteriores análisis bioquímicos:

- **Análisis farmacocinético del D-Pinitol en plasma e hígado.** Método de cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC/MS).
- **Medición de metabolitos plasmáticos.** Glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, bilirrubina, triglicéridos, glutamato-oxalacetato transaminasa, glutamato-piruvato transaminasa y gamma-glutamyl transferasa.
- **Medición de hormonas asociadas a la homeostasis de la glucosa y citoquinas en plasma.** Leptina, adiponectina, insulina, grelina, glucagón e IGF-1.
- **Cálculo de índices HOMA.**
- **Monitoreo de estrés oxidativo (malondialdehído) y cuerpos cetónicos plasmáticos.**
- **Medición de glucógeno y del contenido de lípidos totales en hígado.**
- **Medición y análisis de la expresión génica en hígado.** Mediante qPCR se cuantificó la expresión de diferentes genes (*Fbp1*, *G6pc*, *Pc*, *Fasn*, *Acaca*, etc.).
- **Medición y análisis de la expresión proteica en hígado, hipotálamo e hipocampo.** Mediante Western Blot se cuantificó la cantidad relativa y estado de activación de diferentes proteínas (Akt, IRS-1, GSK-3, tau, etc.).

Estudios en humanos

Se reclutaron un total de 25 voluntarios sanos entre el personal de laboratorio y el personal clínico del Laboratorio de Neuropsicofarmacología del Hospital Regional Universitario de Málaga. Todos los sujetos mostraban una ausencia de obesidad (IMC menor de 30), así como de cualquier enfermedad metabólica diagnosticada o tratada.

Todos los estudios se realizaron en condiciones de ayuno. Dependiendo del estudio los sujetos tomaron una dosis oral de D-Pinitol (15 mg/Kg o 5 mg/Kg), de jarabe de algarroba (50 g), de glucosa (50 g) o de jarabe de agave (50 g); siendo todos los compuestos diluidos en 100 mL de agua. Después de la ingesta, a los sujetos se les tomó muestras de sangre a diferentes tiempos para posteriores análisis.

A partir de las muestras de sangre recogidas, se extrajo el plasma y este se almacenó a -80 °C hasta los posteriores análisis bioquímicos:

- **Cuantificación de D-Pinitol.** Método de cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC/MS).
- **Monitoreo de la concentración de glucosa y fructosa.**
- **Medición de hormonas que regulan la homeostasis de la glucosa.** Insulina, glucagón o grelina activa.
- **Medición de ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos.**
- **Cálculo del índice glucémico del jarabe de algarroba y del índice HOMA.**
- **Monitoreo de hormonas pituitarias, gonadotropinas y cortisol.**

Cultivo celular y diseño experimental *in vitro*

Se cultivaron células β INS-1E de insulinoma de rata. Estas se incubaron, por un lado, en medio con una concentración basal de glucosa (3 mM); y por otro, en medio con alta concentración de glucosa (11 mM) durante 15 h. A continuación, ambos grupos se estimularon durante 30 minutos con diferentes concentraciones de D-Pinitol. La incubación se detuvo y se

recogieron los sobrenadantes y el lisado de proteínas para comprobar el efecto del D-Pinitol sobre la secreción de insulina y sobre proteínas relacionadas con esta secreción.

3.5. Resultados y discusión

La consecución de los objetivos propuestos generó una serie de resultados que han sido publicados en tres artículos científicos y que a continuación se resumen.

Primera publicación. “D-Pinitol from *Ceratonia siliqua* is an orally active natural inositol that reduces pancreas insulin secretion and increases circulating ghrelin levels in Wistar rats”

En este primer estudio se proporciona una nueva perspectiva sobre la absorción oral y los efectos metabólicos del D-Pinitol en condiciones de **ayuno**, cuando se espera que la glucosa circulante esté en niveles basales. Se observó una **rápida absorción, distribución y eliminación del D-Pinitol en plasma e hígado; sin exhibir signos de toxicidad**, lo que abre la puerta a su utilización como ingrediente nutricional activo.

En el modelo de rata Wistar en ayunas usado en este estudio, el principal efecto de la administración de D-Pinitol fue una **reducción significativa de los niveles de insulina circulante**, lo que, unido a un **aumento del nivel de glucagón**, llevó a un aumento de la ratio glucagón/insulina. Este hecho podría ser causado por una hipoglucemia inicial con tendencia a prolongarse. Esta posibilidad que se plantea se basa en las propiedades insulino-miméticas que se le atribuyen al D-Pinitol en el músculo esquelético, donde promueve la translocación de GLUT4 a membrana (52), facilitando la captación de glucosa circulante y rebajando la hiperglucemia posprandial. Por tanto, sería concebible que, en las condiciones de ayuno, el D-Pinitol promoviera una hipoglucemia transitoria en los primeros minutos debido a su acción sobre el músculo, un efecto que no se ha detectado en este estudio porque las medidas de parámetros metabólicos y bioquímicos se empezaron a evaluar a los 60 min después de la ingesta, un tiempo suficiente para que se pusiese en marcha la maquinaria hepática de la glucogenólisis y gluconeogénesis mediadas por el glucagón, para así equilibrar la concentración de glucosa sanguínea, manifestándose una normoglucemia. De hecho, es muy plausible que la bajada de niveles de insulina se vea favorecida por esa posible hipoglucemia inicial. Estos hechos se reflejan en una **disminución del índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR)**, y, por tanto, en una mejora de la sensibilidad a esta hormona.

Los resultados de este trabajo también indican que el D-Pinitol conduciría a la reducción de la ruta glucolítica en el hígado a través de la disminución de la expresión génica de *Pklr*, como consecuencia de un aumento de la ratio glucagón/insulina. Asimismo, tras la toma de D-Pinitol se observó una inhibición de IRS-1 y Akt, y un aumento de la actividad de GSK-3 β en hígado, apuntando a un **estado hipoactivo del receptor de la insulina** en este órgano, lo que también es compatible con una fase de ayuno y con los bajos niveles de insulina detectados en plasma. Otros trabajos muestran que el D-Pinitol sí que puede activar la vía de la PI3K/Akt en el hígado, pero este efecto se muestra en un modelo de diabetes con una hiperglucemia manifiesta (53).

Por otro lado, en este estudio se muestra por primera vez que la administración de D-Pinitol produce un **aumento de los niveles de grelina en plasma**. Se sabe que la grelina inhibe la secreción de insulina en las células pancreáticas (54,55), lo que sugiere que el D-Pinitol pueda ejercer un efecto inhibitorio de la secreción de insulina a través del aumento en los niveles de grelina observados *in vivo*. Pero, aparte de este efecto indirecto del D-Pinitol sobre la secreción de insulina, nuestros hallazgos *in vitro* sobre células de insulinoma de rata INS-1E también apoyan la noción de que el D-Pinitol inhibe la secreción de insulina de forma

directa sobre las células β . En las células INS-1E de hecho se aprecia que la activación de ERK1/2 (que es inducida por una alta concentración de glucosa, un mecanismo molecular dependiente de Ca^{2+} y vinculado a la activación de la producción y secreción de insulina (56)), está claramente disminuida en presencia de D-Pinitol. En cualquiera de los casos, sea de forma indirecta o directa, lo que es patente es la bajada de los niveles de insulina tras una toma de D-Pinitol en ayunas.

Una limitación a tener en cuenta en este primer estudio es la falta de información sobre la acción del D-Pinitol en el músculo esquelético en condiciones de ayunas, además de sobre otros tejidos que responden metabólicamente a la insulina, como el tejido adiposo o el cerebro. Pero, en cualquier caso, este trabajo permite considerar al D-Pinitol como un producto natural de gran valor **páncreo-protector**, ya que evitaría una excesiva producción de insulina, un hecho clave en el desarrollo de resistencia a la insulina, y que conduce al agotamiento del páncreas endocrino y a la aparición de diabetes tipo 2.

Segunda publicación. "Pharmacokinetics and endocrine effects of an oral dose of D-Pinitol in human fasting healthy volunteers"

En el segundo estudio de esta tesis se muestra el perfil farmacocinético del D-Pinitol cuando se administra por vía oral puro (disuelto en agua, 15 mg/Kg) a voluntarios humanos sanos en ayunas. Los datos revelan un **período prolongado de absorción y una larga vida media**. Es remarcable que otro grupo experimental de voluntarios consumió jarabe de algarroba, que además de D-Pinitol, presenta varios monosacáridos y sacarosa en su composición (45,6% glucosa, 47,3% fructosa, 0,5% sacarosa y 3,2% D-Pinitol). Aunque la dosis final de D-Pinitol que tomaron estos sujetos fue un **40% superior** a la utilizada en el grupo anterior al que se administró solo D-Pinitol puro, tanto la vida media como la C_{max} fueron muy parecidas; lo que demuestra que los **carbohidratos interfieren con la absorción del D-Pinitol**, probablemente debido a la competencia de la glucosa y la fructosa por el transportador de inositol (57).

En este estudio también se describen los efectos farmacológicos del D-Pinitol tanto sobre la glucemia, como sobre la secreción de hormonas relacionadas con la homeostasis de la glucosa en humanos sanos en ayunas. La administración de 15 mg/Kg de D-Pinitol resultó en un **perfil farmacológico muy similar al encontrado en el anterior modelo preclínico de roedor**, observándose una pequeña **disminución de la insulinemia** tras la ingesta, sin afectar a la glucemia, mientras que **los niveles de glucagón aumentaron rápidamente**. Este perfil metabólico se explicó en los modelos preclínicos *in vivo* e *in vitro* del primer estudio de esta tesis por dos mecanismos: a) una acción inhibitoria directa del D-Pinitol sobre la secreción de insulina en las células β , a través de la modulación de la señalización de ERK1/2; y b) una inhibición de la secreción de insulina ejercida por la grelina. En ausencia de datos experimentales sobre las acciones del D-Pinitol en islotes pancreáticos humanos, no se puede confirmar el efecto sobre la señalización de ERK1/2; sin embargo, sí que se observa un **incremento de los niveles plasmáticos de grelina acilada** (forma activa) 60 min después de la ingesta de D-Pinitol. Por otro lado, la sorprendente estabilidad de la glucemia a pesar de la reducción en la secreción de insulina y los aumentos de glucagón, también se encuentra en línea con los hallazgos del primer estudio, y en el que se discute la posibilidad de que el D-Pinitol en ayunas ejerza su acción sobre el músculo para incentivar la captación de glucosa sanguínea causando una hipoglucemia transitoria en los primeros minutos tras la administración, siendo rápidamente compensada por la acción del glucagón.

Asimismo, se ha comprobado que el consumo de D-Pinitol en humanos sanos en ayunas **no resultó en una disminución de los FFA circulantes**. Se puede interpretar que el D-Pinitol sostiene la liberación de FFA a través de las acciones del glucagón, pues los niveles de

esta hormona se vieron aumentados. Este hallazgo puede tener un potencial terapéutico muy interesante en la **esteatohepatitis no alcohólica (NASH)**, donde el consumo de D-Pinitol podría reducir la esteatosis hepática reduciendo los depósitos de ácidos grasos; algunos datos publicados recientemente respaldarían esta hipótesis (58).

El hecho de que la administración de D-Pinitol diera como resultado una mayor liberación de grelina, junto con los conocidos efectos de los inositoles en el eje gonadal (59,60), nos llevó a examinar el impacto de este compuesto en los niveles circulantes de hormonas pituitarias. Sorprendentemente, el D-Pinitol a las dosis estudiadas, **solo afectó a la secreción de la hormona del crecimiento (GH), disminuyéndola**, mientras que las concentraciones circulantes de PRL, TSH o gonadotropinas (LH, FSH) no sufrieron cambios. La disminución de GH resultaba intrigante porque se esperaba un perfil opuesto; por una parte, el aumento de la grelina, que es un secretagogo de la GH, debería de aumentar sus niveles; por otra, la disminución de la insulina, que es un inhibidor de la liberación de GH por parte de las células somatotrofas (61–63), también debería hacer que los niveles de GH aumentaran. En este sentido, algunos datos experimentales en modelos animales podrían explicar este resultado inesperado (64), estos datos sugieren que el D-Pinitol podría ejercer una potente acción insulino-mimética en el hipotálamo, lo que podría llevar a una desregulación del control hipotalámico de la GH a través de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH). Por lo tanto, el D-Pinitol, a través de su capacidad insulino-mimética en el hipotálamo, podría tener un efecto inhibitorio de la secreción pituitaria de GH; aunque aún se desconoce si este efecto estimulante del D-Pinitol sobre la señalización de la insulina en hipotálamo ocurre en humanos.

En general, este estudio en humanos reafirma que el consumo de D-Pinitol presenta un efecto **protector/preventivo en el páncreas endocrino**, ya que ayuda a reducir la carga de secreción de insulina y, por tanto, reduce uno de los principales factores que contribuyen al agotamiento del páncreas. Además, se sugiere un **posible papel preventivo del D-Pinitol en el desarrollo de la esteatosis hepática**, a través del efecto estimulador de la secreción de glucagón, que debería de incentivar la lipólisis y el trasiego de ácidos grasos libres al hígado para su posterior oxidación en la mitocondria. Sin embargo, aún se necesita más investigación para esclarecer completamente este hipotético papel terapéutico de la ingesta de D-Pinitol. También hay que recalcar que el número de sujetos sometidos al tratamiento fue pequeño, lo que podría afectar a la evaluación de ciertos efectos endocrinos. No obstante, se puede considerar que el tamaño muestral elegido es consistente con los objetivos del estudio, y suficiente para determinar los parámetros farmacocinéticos de la administración oral de D-Pinitol, propósito principal de esta investigación.

Tercera publicación. “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”

La justificación del tercer estudio es comprobar si es posible mejorar la respuesta fisiológica normal a la ingesta de endulzantes calóricos, impulsando para ello los mecanismos moduladores endógenos que ayudan tanto a mantener el peso como a sostener el gasto de energía. Para este fin se usó el **jarabe de algarroba**, debido a su composición simple y equilibrada en fructosa, glucosa y D-Pinitol, manteniendo la palatabilidad dulce y el valor calórico correspondiente.

Los datos revelan que la administración aguda de jarabe de algarroba a humanos sanos en ayunas, junto con un aumento de los niveles de D-Pinitol en plasma, produce un **menor aumento de la glucemia** en comparación con la administración de glucosa en solitario, presentando un **mejor índice glucémico** y siendo un edulcorante más eficaz para tornar la

glucemia a niveles basales. Estos resultados muestran que al agregar D-Pinitol se mejora el manejo que el organismo hace de la glucosa, así como la respuesta de la insulina, ya que esta fue **más breve y menos intensa** (reduciendo el índice HOMA-IR). Curiosamente, la presencia de fructosa y glucosa en el jarabe **no está asociada con una disminución de los ácidos grasos libres circulantes**, algo descrito tanto para la glucosa como especialmente para la fructosa (65), lo que sugiere que el **D-Pinitol frena las acciones antilipolíticas/prolipogénicas de ambos monosacáridos**. Además, las concentraciones plasmáticas de fructosa tras la ingesta del jarabe de algarroba son limitadas en el tiempo, lo que sugiere un papel relevante del D-Pinitol en su regulación, ya que hay que señalar que, en comparación con el jarabe de agave (basado principalmente en fructosa), la duración e intensidad del pico plasmático de fructosa fueron mucho menores a las esperadas con el jarabe de algarroba.

Otro resultado curioso de la administración de jarabe de algarroba a humanos, es que no se aprecia un aumento de la concentración plasmática de grelina con respecto a los niveles basales, posiblemente por la presencia de glucosa en el jarabe, que puede estar inhibiendo la secreción de grelina tras una administración aguda.

En este punto, este tercer trabajo se complementó con ensayos sobre un modelo de rata. En primer lugar, para confirmar que la disminución de la excursión (variación incremental) de glucosa en sangre observada tras la administración del jarabe de algarroba en humanos (en comparación con la administración de solo glucosa) no se derivaba de la diferente cantidad de glucosa administrada, se analizó la glucemia de ratas Wistar tras la administración de: A) glucosa pura (2 g/Kg), o B) una dosis de jarabe de algarroba que contuviera la misma cantidad de glucosa (2 g/Kg). Los datos indican que **la variación de la glucemia fue sustancialmente menor en los animales que recibieron el jarabe**, lo que respalda la actividad sensibilizadora de la insulina que ejerce el D-Pinitol. A estos resultados hay que sumar que la administración repetida de jarabe de algarroba durante 8 días, mejoró la glucemia cuando se sometió a los animales a una prueba de tolerancia a la glucosa (en comparación con animales que solo tomaron agua durante esos 8 días).

En esta parte del estudio con el modelo de rata Wistar, se testó los efectos metabólicos que podía producir la toma **crónica** de jarabe de algarroba durante 10 días. A la vez, y de forma complementaria, también se llevó a cabo un ensayo paralelo en el que se administraba D-Pinitol puro disuelto en la bebida (100 mg/Kg/día) durante esos 10 días. Al terminó del procedimiento, no se observó que el tratamiento crónico con D-Pinitol puro ni con jarabe de algarroba redujeran la concentración de insulina en plasma a pesar de que los niveles plasmáticos de grelina aumentaron en el grupo de animales tratados con el jarabe. Asimismo, a pesar de que no se detectó un aumento significativo de los niveles de glucagón en sangre, sí que se pudo apreciar en ambos tratamientos crónicos (D-Pinitol puro y jarabe de algarroba) una tendencia a aumentarlos. De hecho, se vuelve a observar **una tendencia (aunque no significativa) a aumentar la ratio glucagón/insulina**, un efecto que ya se describió en los dos primeros estudios de esta tesis. Es decir, el D-Pinitol administrado de forma crónica tanto en su estado puro, como formando parte del jarabe, tiende a mantener un carácter metabólico “pro-glucagón”.

De especial interés resultó que los **depósitos de grasa y de glucógeno en el hígado disminuyeran** tras el tratamiento crónico con jarabe de algarroba en ratas Wistar. Una posible explicación es que la ingesta de D-Pinitol presente en el jarabe dirige el metabolismo hepático hacia la exportación de glucosa y la oxidación de lípidos, un aspecto que tiene relación con la función del glucagón. De hecho, este efecto fisiológico del glucagón se ha incorporado a los últimos fármacos antiobesidad/antiesteatosis como son los triples agonistas de glucagón/GIP/GLP-1 (Retatrutida). En nuestros experimentos, esta idea se vio sustentada en los resultados en los que se puede observar una potenciación de la expresión de genes de

enzimas implicadas en la **gluconeogénesis**, como *Pck1* y *G6pc*; así como una intensificación de la ruta de **β -oxidación de los ácidos grasos**, reflejada en el aumento de la expresión génica de *Acox-1* y *Cpt1*, además de la fosforilación oxidativa en mitocondria manifestada por la expresión incrementada de *Cox4i1*. Cabe destacar que, tanto con el tratamiento crónico de jarabe como con el de D-Pinitol puro, **aumentaron las concentraciones plasmáticas de urea, pero no las de ácido úrico**, lo que también sugiere una activación de la ruta del glucagón.

Estos efectos sobre la oxidación de lípidos tras el tratamiento crónico con jarabe de algarroba en ratas Wistar no se acoplaron con una exportación plasmática de β -hidroxibutirato, ni dieron como resultado la producción de cetonas, lo que indica que este aumento en la oxidación de ácidos grasos no se usó para generar cuerpos cetónicos como proveedores de glucosa; cosa que tampoco ocurría en humanos, dónde los niveles plasmáticos de β -hidroxibutirato y de cetonas tampoco aumentaron tras la ingesta aguda de jarabe de algarroba. Sumado a todo esto, no se encontró evidencia de estrés oxidativo, ya que el malondialdehído en hígado, un marcador de peroxidación lipídica, no aumentó después del consumo de jarabe de algarroba. Por lo tanto, el perfil general del jarabe de algarroba es el de un **edulcorante seguro a corto/medio plazo**, que favorece las acciones del glucagón y que además es capaz de impedir los efectos no deseados de la fructosa, fuertemente relacionados con la esteatosis hepática. Por supuesto son necesarios estudios en los que se lleve a cabo una exposición al jarabe de algarroba a largo plazo (de 4 a 8 meses), para de esta forma asegurar completamente la ausencia de toxicidad asociada a la fructosa presente en su composición.

Por último, otro aspecto a destacar, es que tras 10 días de tratamiento con jarabe de algarroba disuelto en la bebida de ratas Wistar, no se observó una activación de la vía de síntesis de glucógeno en hígado, pero sí una tendencia a inhibir la actividad de GSK-3 β en hipotálamo; y sobre todo una clara disminución de la fosforilación de la proteína tau en hipocampo. La posibilidad de que el jarabe presente acciones neuroprotectoras en un escenario de taupatía deberá estudiarse más en profundidad, pero sí queda patente que el perfil de resultados obtenidos en cerebro es muy similar al descrito en condiciones experimentales en las que se administró D-Pinitol en solitario (64,66).

En conjunto, los resultados expuestos sugieren que el D-Pinitol presente en el jarabe de algarroba es bioactivo y que la presencia de glucosa y fructosa no afecta a sus propiedades farmacológicas.

Aunque esta tesis abre posibilidades muy prometedoras para el uso del D-Pinitol como fármaco y del jarabe de algarroba como alimento funcional, todavía quedan aspectos sin explorar en relación a sus mecanismos de acción y sus efectos. Por lo que es importante seguir estudiando el impacto del D-Pinitol en diferentes escenarios, describir con mayor profundidad como puede ayudar a mejorar el perfil metabólico de endulzantes, y por supuesto, comprobar sus efectos a largo plazo.



4. INTRODUCCIÓN

La presente tesis doctoral nace del trabajo realizado en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA Plataforma BIONAND) con la colaboración de la empresa biotecnológica malagueña Euronutra S.L., y bajo el amparo de la Universidad de Málaga. Se encuentra avalada por la publicación de tres artículos en revistas científicas y una patente, y pretende establecer una nueva perspectiva para combatir dos enfermedades enormemente extendidas entre la población mundial: **la diabetes y la obesidad**. Como se desarrollará más extensamente en próximos apartados, estas enfermedades presentan una prevalencia realmente preocupante: en el año 2021, el 10,5% de la población mundial de entre 20 y 79 años padecían diabetes, suponiendo la diabetes tipo 2 más del 90% de los casos diagnosticados (1); por otro lado, en 2020, el 38% de la población mundial (mayor de 5 años) presentaban sobrepeso u obesidad (2). Además, las previsiones de futuro auguran un panorama mucho más alarmante, con estimaciones que pronostican un aumento tanto en número de obeso como de diabéticos. En el caso concreto de España, en 2021 el 10,3% de la población de entre 20 y 79 años padecía diabetes (1), siendo uno de los países europeos con mayor prevalencia de esta enfermedad, y en torno al 27% de adultos presentaba obesidad en 2020, esperándose un aumento para 2035 hasta alcanzar alrededor del 37% (2).

En definitiva, estas enfermedades suponen un enorme reto para los sistemas de salud de todo el mundo, primero por la reducción de calidad de vida de las personas afectadas, que además tienen una alta probabilidad de sufrir otras dolencias derivadas, e incluso en los peores casos (normalmente sin supervisión médica) pueden llevar a la muerte del paciente. Pero en segundo plano también aparece el impacto económico que estas enfermedades tienen, siendo del orden de miles de millones de dólares americanos anuales. De hecho, se ha alcanzado un punto en el que estas dos enfermedades se han convertido en pandemias, y por la estrecha relación que guardan, se retroalimentan y es común que una de lugar a la aparición de la otra, especialmente la obesidad, que es el principal factor de riesgo para desarrollar diabetes tipo 2.

Actualmente el tratamiento más eficaz para mejorar, y sobre todo prevenir, el desarrollo de estas enfermedades es llevar un estilo de vida saludable. Pero lo que a priori parece de fácil aplicación, para muchas personas se puede convertir en un auténtico reto, pues son muchos los condicionantes que se ven implicados. De hecho, a nivel global se está produciendo un envejecimiento de la población (67), un aumento del desarrollo económico general (1) y un aumento de la población que vive en zonas urbanas (68), lo que conduce de forma indirecta a estilos de vida más sedentarios (69) y a un mayor consumo de alimentos poco saludables que disparan el riesgo de sobrepeso, obesidad y, por tanto, de diabetes (70). Todos estos factores hacen que, a nivel mundial, la prevalencia de estas enfermedades sea alta y que esté aumentando (1). Además, otra circunstancia a tener en cuenta es la mayor tasa de supervivencia que presentan los afectados, ya que cada vez se produce una detección más temprana de estas enfermedades, lo que facilita la aplicación de tratamientos más eficaces y la prevención de complicaciones.

Una vía de actuación clave es controlar la presencia de carbohidratos en la dieta. El uso de edulcorantes artificiales se perfiló como una posible solución, pero como se comentará más adelante, no han proporcionado los resultados que se esperaba; y, además, cada vez hay más dudas en torno a la seguridad de su uso a largo plazo.

Con todo lo anterior en mente, en este trabajo se aborda el problema desde otro punto de vista: usar suplementos alimenticios que mejoren el metabolismo que el propio organismo hace de los carbohidratos. Es decir, incorporar **ingredientes naturales funcionales** a formulaciones alimenticias, que mantengan su palatabilidad, pero que ayuden al cuerpo a llevar a cabo un correcto procesamiento de los azúcares y eviten la excesiva transformación de estos en grasa. En esta tesis doctoral se propone a los inositoles, y en concreto al D-Pinitol,

como esta sustancia natural que debe ser considerada como un ingrediente activo para preparaciones de endulzantes saludables.

Pero antes de llegar a los inositóles en general, y al D-Pinitol en particular, se debe profundizar en la diabetes y en la obesidad, saber cuáles son sus causas y consecuencias, así como la estrecha relación que mantienen. Y para ello, lo mejor es comenzar conociendo a una hormona clave para el metabolismo de los carbohidratos, y que se ve especialmente afectada con el desarrollo de estas dolencias: la insulina.

4.1. Insulina

4.1.1. Producción y secreción

La insulina es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos, en su etapa madura está formada por dos cadenas: una cadena A de 21 residuos y una cadena B de 30 residuos, unidas por dos enlaces disulfuro, con un enlace disulfuro adicional ubicado dentro de la cadena A (71). La síntesis y liberación de insulina es llevada a cabo por las células β del páncreas, las cuales se encuentran formando parte de pequeños grupos de células conocidos como islotes de Langerhans (72).

En humanos, el proceso de síntesis de la insulina comienza con la transcripción del gen *INS* (en el caso de roedores, los genes *ins1* e *ins2*), a partir del ARNm obtenido se produce la traducción de la preproinsulina, esta es procesada en el retículo endoplasmático rugoso, donde se produce la escisión de su secuencia señal, se pliega y se estabiliza, dando lugar a la proinsulina (73). La proinsulina es un polipéptido monocatenario en el que el extremo C de la cadena B está unido al extremo N de la cadena A mediante el llamado péptido C (71), después de su formación se produce el tránsito hacia el aparato de Golgi, en este orgánulo se clasifica en gránulos secretorios aún inmaduros y se produce la eliminación enzimática del péptido C para dar lugar a la insulina madura (73). Los gránulos que contienen el péptido C y la insulina ya madura, quedan en el citoplasma a la espera de recibir la señal adecuada para liberar su contenido al medio extracelular, por lo que péptido C e insulina son secretados en cantidades equimolares. Una vez que la hormona se encuentra en su forma final, es empaquetada formando hexámeros para su almacenamiento en los gránulos. Cuando se produce el estímulo necesario para la secreción de insulina, se liberan estos hexámeros al medio extracelular, donde se disocian dejando a las 6 moléculas de insulina libres en su forma monomérica, siendo esta biológicamente activa (74).

Las células β pancreáticas se encargan de monitorear y responder a los nutrientes de la dieta, con el fin de secretar la insulina necesaria para las necesidades del organismo (5). La respuesta de las células β a los nutrientes requiere de una activación metabólica, lo que resulta en la producción de señales de estímulo-secreción que promueven la biosíntesis de insulina, el movimiento de vesículas que contienen insulina hacia la superficie celular y la liberación de esta hormona al medio. Aunque nutrientes como los aminoácidos o los ácidos grasos pueden desencadenar la liberación de insulina (por medio de señales neurohormonales), el principal y más importante estímulo para este fin es la entrada de glucosa en la célula (5). Esta **secreción de insulina estimulada por glucosa** es fundamental para el control normal de la glucemia, pudiendo ser modulada a su vez por aminoácidos, ácidos grasos libres y otros secretagogos no nutricionales, como hormonas incretinas, factores de crecimiento o neurotransmisores (75); y su deterioro es un sello distintivo de la diabetes tipo 2 (5).

Tras el aumento de los niveles de glucosa en sangre originado por la ingestión de comidas que contienen carbohidratos, se produce la entrada de glucosa a las células β

pancreáticas a través de transportadores específicos. Esta glucosa es rápidamente fosforilada a glucosa-6-fosfato por la glucoquinasa, produciéndose después la oxidación completa de esta molécula en la mitocondria, lo que lleva a la producción de ATP y a un aumento en la relación ATP/ADP (5,75). Este proceso conduce al cierre de los canales de potasio sensibles al ATP, provocando la despolarización de la membrana celular y permitiendo la entrada de Ca^{2+} a través de la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Los niveles elevados de Ca^{2+} intracelular inducen la exocitosis de los gránulos, que contienen la insulina, presentes en el citoplasma de las células β , y, por lo tanto, la secreción de esta hormona (5,75).

Fisiológicamente en un individuo sano en periodo de ayuno, la insulina se libera continuamente en niveles muy bajos como respuesta a la producción de glucosa hepática, lo hace de forma pulsátil cada 5-6 min y participa en el mantenimiento de la concentración normal de glucosa en sangre, constituyendo este proceso la **fase basal** de secreción de insulina (76). En un periodo absorptivo, y tras la ingesta de carbohidratos, se produce un aumento de la glucemia, lo que desencadena una mayor producción y secreción de insulina que ocurre de manera bifásica (75–77):

1. En una **primera fase**, ocurre un rápido e intenso aumento de la insulina en sangre, estimulado por la entrada directa de glucosa en las células β , alcanzando un pico a los 5-10 min y descendiendo hasta niveles por encima de los basales a los 30 min después del inicio de la ingesta. Esta liberación de insulina se produce por eventos intracelulares que promueven el aumento de Ca^{2+} citosólico en las células β , y que ocasionan la exocitosis de los gránulos de insulina que se encuentran ya preparados cerca de la membrana celular (fácilmente liberables). La liberación de insulina también es importante para contrarrestar rápidamente el efecto del glucagón en la producción de glucosa hepática.
2. Seguidamente se produce una **segunda fase** lenta en la que la secreción de insulina es menor pero más prolongada, alcanzando una meseta a los 30 min tras la ingesta, con una duración de varias horas dependiendo de la cantidad de glucosa que se vaya liberando de la digestión de los hidratos de carbono consumidos. Durante esta fase se sigue contrarrestando el efecto del glucagón en hígado y se favorece la activación del gen de la insulina para producir **síntesis de novo**, aumentando el suministro de nuevos gránulos. Gracias a esta secreción mantenida, se consigue la concentración de insulina circulante necesaria para estimular la absorción de glucosa por parte de los miocitos en reposo y de los adipocitos periféricos. Este mecanismo regulador mantiene los niveles de glucosa en sangre dentro de un rango estrecho.

La segunda fase de la secreción de insulina es dependiente de potenciadores como hormonas intestinales, determinados aminoácidos y neurotransmisores:

- En respuesta a diferentes nutrientes de la dieta (ácidos grasos libres, aminoácidos, hidratos de carbono), células enteroendocrinas del tracto gastrointestinal liberan **hormonas** como la CCK (células I), la PYY (células L), o las incretinas GIP (células K) y GLP-1 (células L); las cuales favorecen la producción y secreción de insulina de las células β ayudando a la despolarización de la membrana externa o activando el gen que codifica la insulina. Este tipo de hormonas también ejercen otras acciones como retrasar el vaciado del estómago, disminuir la ingesta o controlar el apetito (78). De esta forma se evitan los picos de glucosa que derivan de la digestión de hidratos de carbono complejos.
- A través de la dieta también se pueden incorporar **aminoácidos** secretagogos de la insulina, concretamente tres: arginina, glicina y alanina. Su entrada en la célula β

conduce a cambios iónicos que despolarizan la membrana, activando la captación de Ca^{2+} y estimulando la exocitosis de los gránulos que contienen la insulina (79,80).

- Por otro lado, las células α pancreáticas humanas, también presentes en los islotes de Langerhans, son capaces de sintetizar, almacenar y secretar acetilcolina. La acetilcolina es un **neurotransmisor** que es liberado por las células α debido al aumento de la concentración de glucosa, y puede activar el receptor muscarínico que las células β adyacentes expresan en su superficie. De esta forma, la acetilcolina actúa como una señal paracrina que promueve el aumento del Ca^{2+} libre citoplasmático, y, por lo tanto, la secreción de insulina (81,82).

Se estima que la vida media farmacológica de la insulina está entre los 5-8 min, eliminándose principalmente mediante la actividad de la insulina en el hígado, los riñones y algunos otros tejidos (75). Una vez que la insulina es secretada por las células β del páncreas, es transportada hasta el hígado a través de la circulación portal. El hígado actúa como filtro y regula la cantidad de insulina que llega a los tejidos periféricos a través de un proceso de aclaramiento, en el que puede eliminar más del 50% de la insulina que recibe (73). La insulina restante sale del hígado a través de la vena hepática, desde donde sigue la circulación venosa hasta el corazón, siendo aquí impulsada al resto del cuerpo a través de la circulación arterial. En este punto, la insulina vuelve al hígado y ejerce sus acciones metabólicas en este órgano (volviéndose a eliminar una parte de la hormona recibida), y también es transportada hasta otros tejidos como el músculo y el tejido adiposo, donde estimula la captación de glucosa, o hasta el cerebro. La insulina circulante restante se entrega al riñón que finalmente se encarga de degradarla (73).

4.1.2. Receptor de insulina

La insulina lleva a cabo sus acciones biológicas a través de la **unión con su receptor**, el cuál es una glucoproteína transmembrana que pertenece al grupo de los receptores tirosina quinasa (83). El receptor de la insulina es un heterodímero compuesto por cuatro subunidades que se dividen en dos partes funcionales: dos subunidades α extracelulares que se unen a la insulina, y dos subunidades β con dominios transmembrana e intracelulares que contienen la porción con actividad tirosina quinasa y tirosinas (Figura 1A-B).

Los dominios β se unen a los α mediante puentes disulfuro. La unión de la insulina al receptor provoca un cambio conformacional de la estructura tetramérica de este, haciendo que adopte una forma de T, de manera que los extremos intracitoplásmicos de las cadenas β se acercan para activarse de forma cruzada, iniciando su propia fosforilación en residuos de tirosina (Figura 1C).

Figura 1

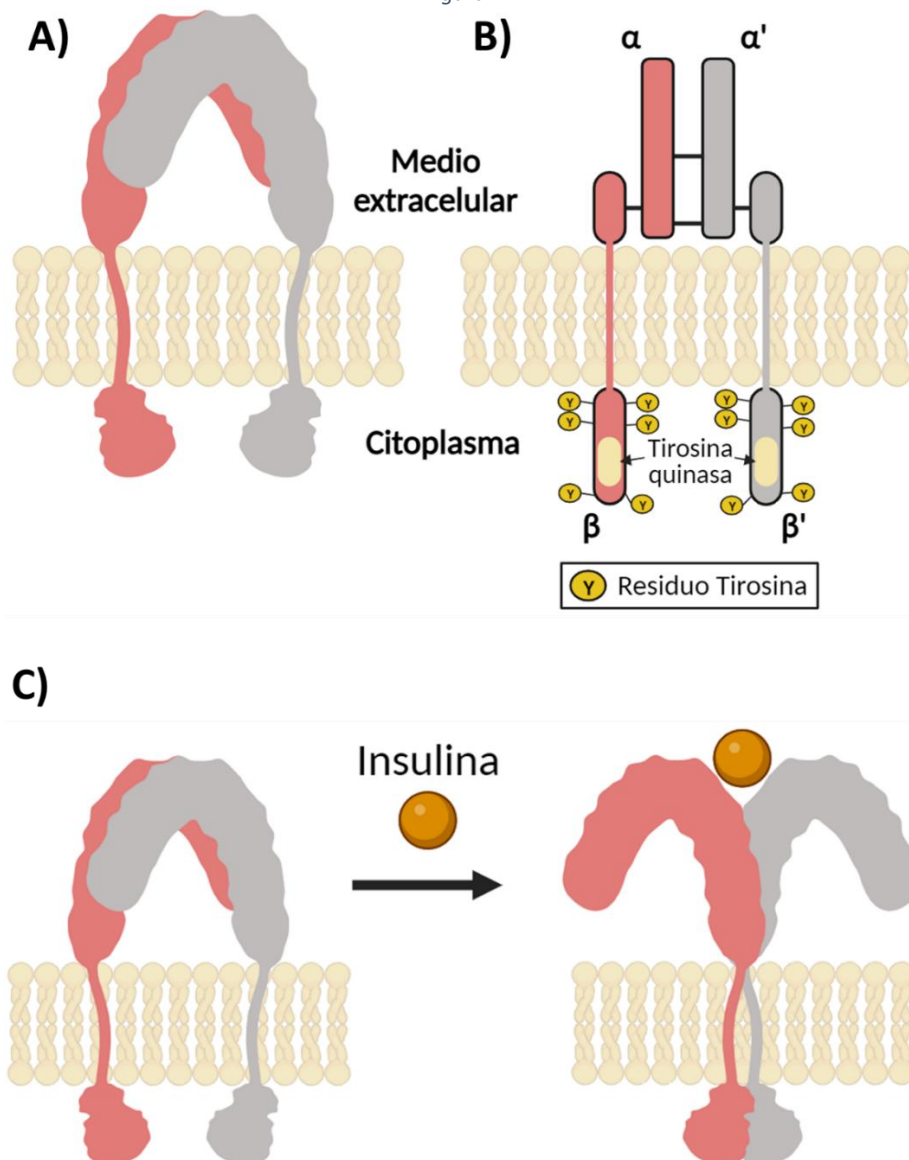


Figura 1. Representación simplificada del receptor de la insulina. **A)** modelo estructural; **B)** dibujo esquemático que muestra ambas partes funcionales: dos subunidades α extracelulares, y dos subunidades β con dominios transmembrana e intracelulares que contienen la porción con actividad tirosina quinasa y numerosos residuos tirosinas; **C)** cambio conformacional que sufre el receptor de la insulina cuando se une a su ligando. Figura creada usando las herramientas y representaciones disponibles en BioRender.com.

El receptor de insulina (InsR) puede presentar dos isoformas que se generan por empalme alternativo: InsRA e InsRB, aunque las diferencias entre ambas en lo referente a su papel fisiológico y patológico aún no se conocen completamente, sí es conocido que InsRB es más abundante en los tejidos adultos (especialmente hepático, adiposo, muscular esquelético y renal) y principalmente ejerce las acciones metabólicas de la insulina; mientras que InsRA se expresa con mayor proporción durante el período fetal/prenatal así como en neuronas, ovarios y varios tipos de células cancerosas, y mayoritariamente estimula la proliferación celular (84,85). Un equilibrio en el perfil de expresión de ambas isoformas es importante para la correcta actividad del organismo, ya que una desregulación en este perfil se ha asociado con el desarrollo de diferentes patologías, como cáncer, resistencia a la insulina, diabetes, obesidad o aterosclerosis; de hecho, un aumento significativo de la ratio InsRA/ InsRB confiere una

ventaja proliferativa y migratoria a los diferentes tipos celulares pero con un detrimento en las acciones metabólicas de la insulina (84).

Hay que tener en cuenta que la insulina y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) son hormonas con una alta similitud estructural y comparten cierta reactividad cruzada, esto es debido a que la insulina puede unirse al receptor de IGF-1 (IGF-1R), y de forma contraria, IGF-1 puede unirse al InsR (31). En el caso de la unión de la insulina con IGF-1R y de IGF-1 con InsRB la afinidad es muy baja, aunque esta es mayor entre IGF-1 e InsRA (84). A diferencia de la insulina, IGF-1 se libera en el hígado, es estimulado por la hormona del crecimiento y circula como un complejo ternario para evitar la actividad hipoglucemiante no específica del IGF-1 libre (31). IGF-1 (junto a IGF-2) regula procesos de proliferación y diferenciación en multitud de tipos celulares, además de ejercer efectos metabólicos similares a los de la insulina (84).

4.1.3. Función dependiente de tejido

Una vez que la insulina secretada alcanza su receptor en la superficie de la célula diana, se desencadena una cascada de señalización específica (detallada más adelante) capaz de producir diferentes efectos dependiendo del escenario proteómico citosólico del tipo celular que estimule. De este modo, la insulina puede orquestrar diversos procesos como crecimiento y proliferación, maduración, supervivencia, metabolismo nutricional (captación de glucosa, síntesis de glucógeno, síntesis de proteínas y lípidos) e incluso modulación de la respuesta inmune. En la Tabla 1 se resumen algunos de estos efectos según el tipo celular que exprese el receptor, y se irán detallando en profundidad a lo largo de esta introducción.

Tabla 1

Tejido / Tipo celular	Efecto metabólico y fisiológico
Hígado / Hepatocito	➤ Inhibición de la síntesis de glucosa y aumento de su oxidación ➤ Aumento de lipogénesis / disminución de β-oxidación de ácidos grasos ➤ Aumento de la síntesis de proteínas ➤ Aumento de síntesis de glucógeno e inhibición de su degradación
Adiposo / Adipocito	➤ Aumento de la captación de glucosa (vía GLUT4) ➤ Inhibición de la lipólisis ➤ Aumento de lipogénesis / disminución de β-oxidación de ácidos grasos ➤ Aumento de la captación y almacenamiento de grasas
Músculo / Miocito	➤ Aumento de la captación de glucosa (vía GLUT4) ➤ Disminución de la β-oxidación de ácidos grasos ➤ Aumento de la síntesis de proteínas ➤ Aumento de la generación de masa muscular ➤ Aumento de síntesis de glucógeno e inhibición de su degradación
Cerebro / Neurona	➤ Aumento de la función cognitiva ➤ Modulación de la fosforilación de la proteína tau ➤ Inhibición del apetito ➤ Aumento de la síntesis de colesterol cerebral ➤ Regulación del metabolismo periférico
Sistema Inmune	➤ Función inmunomoduladora del sistema inmune como adyuvante ➤ Potencia la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF-α) ➤ Favorece la polarización de M2 a M1 ➤ Aumenta la respuesta a IL-2 de células T ➤ Reduce la producción de IL-10 por Treg

Tabla 1. Se presenta de forma resumida los efectos más destacables de la insulina en los principales tejidos sensibles a esta hormona (86–89).

4.1.4. Vías canónicas de señalización del receptor de la insulina

La actividad de la insulina en sus tejidos diana comienza con la unión a su receptor (InsR) en el exterior de la membrana celular, este inicia una cascada de eventos de fosforilación, que a su vez lleva a la activación de enzimas que controlan muchos aspectos del metabolismo y el crecimiento. El mecanismo de acción clásico de la señalización celular estimulada por la insulina ha sido ampliamente descrito y revisado (31,41,90–94), y en la Figura 2 se muestra una representación simplificada. Resumidamente, en el momento de la unión de la insulina con su receptor se produce un cambio conformacional y una autofosforilación de este, lo que conduce al reclutamiento y a la activación por fosforilación en tirosinas de dos familias de adaptadores cruciales: **sustratos del receptor de la insulina** (familia IRS, **vía metabólica**) y **proteínas con homología Src** y colágeno (familia Shc, **vía mitogénica**). Aunque hay que destacar que también existe una tercera vía que implica la activación de la ruta del factor **NF- κ B** y del factor **STAT3** (activador de la proteína de transcripción 3), muy involucrada en la **respuesta inmune**. Como se describe a continuación, estas **vías de señalización canónicas** de la insulina inician procesos con múltiples efectos dependientes de tejido:

❖ **Vía metabólica, IRS/PI3K/Akt** (31,41,90–94): tras la unión de la insulina con su receptor, se produce la inmediata activación/fosforilación de IRS-1 en varios residuos de tirosina (Tyr), lo que a su vez atrae a la subunidad reguladora p85 de la quinasa de inosítoles PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa), que al unirse a su subunidad catalítica (p110) se activa; la PI3K fosforila el carbono 3 de PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) generando PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), que actuará como segundo mensajero en la parte interna de la membrana plasmática. PIP3 atrae a las quinasas PDK y Akt (también conocida como PKB) hacia la membrana, entonces, Akt es fosforilada en dos residuos: en la treonina (Thr) 308 (por la quinasa PDK1) y en la serina (Ser) 473 (por el complejo 2 de la diana de la rapamicina de los mamíferos, mTORC2). La serina-treonina quinasa Akt se encuentra completamente activada cuando se fosforila en ambos sitios, después de lo cual se disocia de la membrana y fosforila muchos sustratos en el citoplasma y el núcleo (Figura 2). La Akt tiene 3 isoformas, de las cuales, la Akt2 es la piedra angular que media en la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina en relación a la homeostasis de la glucosa, además de jugar un papel importante en el control del ciclo y la supervivencia celulares, la apoptosis, y la transcripción de varios genes. Dependiendo del tejido, los procesos principales que regula Akt son los siguientes (95,96):

- **Inhibición de la señalización del receptor del glucagón.** Uno de los sustratos de Akt es la fosfodiesterasa 3 (PDE3B), que degrada AMPc a AMP, impidiendo la activación de la quinasa PKA. PKA es una pieza clave en la vía de señalización mediada por el glucagón, ya que induce glucogenólisis y gluconeogénesis en hígado, y lipólisis en tejido graso.
- **Síntesis de glucógeno.** Otra de las proteínas regulada por Akt es la quinasa de la glucógeno sintasa (GSK-3), que es inactivada al ser fosforilada por Akt en los residuos serina 21 (GSK-3 α) o serina 9 (GSK-3 β) (97). La función de GSK-3 es inhibir mediante fosforilación a la glucógeno sintasa (GS). Cuando la GSK-3 es inhibida por Akt, la GS queda libre y es desfosforilada por la proteína fosfatasa 1 (PP1), quedando en un estado activo para liderar la síntesis de glucógeno en hígado y músculo esquelético (31,41,90–94). Por otro lado, es destacable que la inhibición de GSK-3 producida por Akt, contribuye a regular la fosforilación de la proteína tau en cerebro (la cual está relacionada con la aparición de trastornos neurológicos) (98).
- **Aumento de la captación de glucosa.** Akt promueve indirectamente la traslocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) desde las vesículas presentes en el

citoplasma hasta la membrana plasmática en aquellas células que lo expresan (miocitos y adipocitos) (31,41,90–94).

- **Control de procesos anabólicos.** Akt fosforila e inactiva a los complejos de esclerosis tuberosa 1 y 2 (TSC1/2), lo que hace que se libere una proteína G (Rheb-GTP) que activa a la quinasa mTORC1, esta a su vez activa una serie de proteínas (S6K, 4E-BP, SREBP-1c) que promueven la síntesis de proteínas, lípidos o nucleótidos dependiendo del tipo celular (31,41,90–94,96). Asimismo, mTORC1 fosforila a la quinasa ULK1 y de esta forma **inhibe la autofagia** (99), lo que conduce al crecimiento celular. Por otro lado, Akt también ejerce control sobre la lipogénesis a través de la fosforilación de la ATP-citrato liasa (ACL) (100) y la fosforilación inhibitoria de la enzima AMPK (que conlleva la desfosforilación y la consecuente activación de la acetil-coenzima A carboxilasa (ACC)) (101,102), iniciándose con esto la vía de la lipogénesis en hepatocitos y adipocitos. Este proceso también lleva a la inhibición de la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) (103), por lo que se inhibe la oxidación de ácidos grasos en favor de la lipogénesis.
- **Inhibición de la apoptosis.** Akt promueve la supervivencia celular a través de la inactivación mediante fosforilación de la proteína BAD (pro-apoptótica), y a través de la regulación positiva de Bcl-2 (anti-apoptótica) (104).
- **Regulación de la expresión génica por el factor FOXO.** Akt fosforila al factor de transcripción **FOXO**, lo que provoca su salida del núcleo impidiendo su actividad. De esta forma se inhibe la transcripción de varios de genes, entre los que se encuentra *Pck1* o *G6Pc*, imprescindibles para la gluconeogénesis en el hígado (105,106). En cerebro, la inhibición de la actividad de FOXO por parte de Akt, lleva a la regulación de la ingesta, el equilibrio energético, y el metabolismo periférico (96).
- **Promoción de la senescencia.** La insulina puede acelerar los procesos de envejecimiento mediante el bloqueo de FOXO y la activación de mTORC1. Además de lo mencionado, el factor nuclear FOXO es de vital importancia para la expresión de genes implicados en procesos de apoptosis, enzimas antioxidantes (SOD, catalasas) o proteínas reparadoras del ADN (107,108). Por tanto, su inhibición a través de la vía de señalización de **InsR/AKT/FOXO** promueve la aceleración del envejecimiento tisular. A su vez, la vía AKT/mTORC1 inhibe fundamentalmente el proceso de autofagia (99), lo que impide también procesos de reparación y regeneración celular y, por tanto, la insulina también abocaría a la senescencia tisular a través de esta vía.

❖ **Vía mitogénica, Shc/MAPK** (31,90,91,94): las proteínas Shc son adaptadores sin actividad enzimática que sirven de puente entre el receptor y la vía de señalización corriente abajo. Exhiben en su molécula sitios específicos de unión a residuos en tirosina fosforilados, a través de los cuales se acoplan o bien al InsR (fosforilado en tirosinas) o bien a IRS (también fosforilada en tirosinas). A su vez, ese acercamiento al InsR facilita su propia fosforilación en tirosinas, lo que promueve su acoplamiento al complejo formado por otro adaptador (Grb2) y el factor intercambiador de nucleótido guanosa (SOS), encargado de acelerar la conversión de Ras-GDP a Ras-GTP. Ras, una proteína G monomérica, facilita la activación en cascada de la familia MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos): Raf, MEK y ERK. Mediante esta vía la insulina lleva a cabo sus efectos promotores de la proliferación, la diferenciación y el crecimiento, ya que controla la transcripción de genes relacionados con estos procesos (Figura 2).

Figura 2

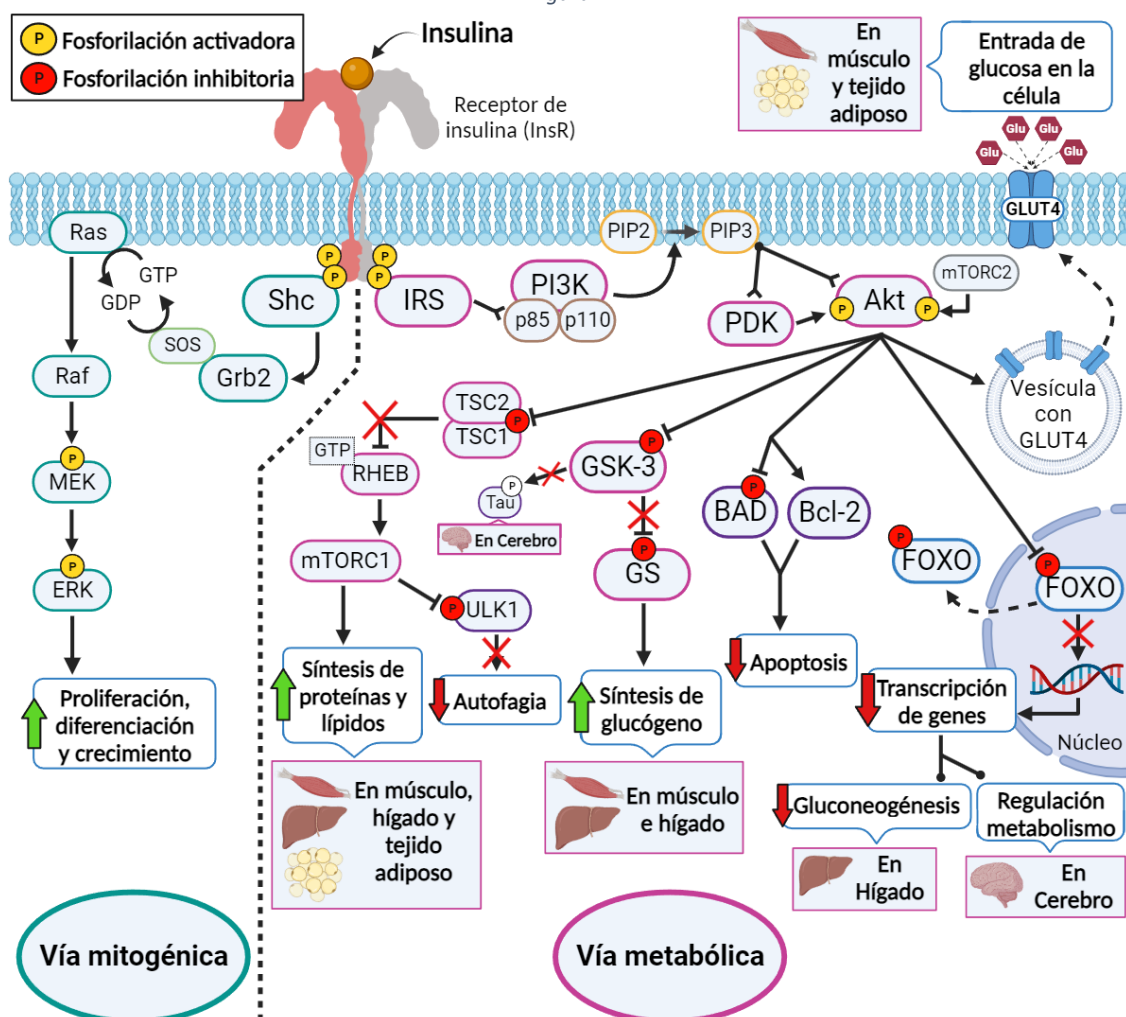


Figura 2. Representación simplificada de las rutas canónicas de señalización de la insulina (mitogénica y metabólica), en la que se puede apreciar los diferentes efectos que produce esta hormona dependiendo del tejido con el que interactúe. Por un lado, figura la vía mitogénica que inicia la activación en cascada de las MAPK, mediante la cual la insulina lleva a cabo sus efectos promotores de proliferación, diferenciación y crecimiento. Por otro lado, aparecen los principales componentes de la vía metabólica, iniciada por IRS, que da lugar a la fosforilación de Akt y como consecuencia se ponen en marcha la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina, ya que Akt es una proteína que regula el transporte de glucosa, la síntesis de proteínas y lípidos, la síntesis de glucógeno, la inhibición de la apoptosis y la autofagia, o la transcripción de ciertos genes. Figura creada usando las herramientas y representaciones disponibles en BioRender.com.

❖ **Vía NF- κ B y STAT3** (89,109): es importante destacar en este apartado que la señalización del InsR es capaz de generar una compleja red de interacciones moleculares de una manera completamente dependiente del contexto, y que además de lo expuesto anteriormente en relación a las dos vías de señalización canónicas, existe una tercera vía que también puede incluir la activación de los **sistemas NF- κ B** y **STAT3**, y con ello controlar la **respuesta inmune**. Estudios recientes proponen que la insulina desempeña un papel fundamental en la regulación de la función de las células inmunes, tanto innatas como adaptativas, a través del ajuste de la programación metabólica intrínseca. Por un lado, existen evidencias que indican que, en determinadas condiciones, la insulina promueve efectos proinflamatorios al alterar el equilibrio entre Th17/Treg en enfermedades autoinmunes. Pero, por otro lado, también hay estudios que indican que la insulina inhibe la respuesta inflamatoria no solo al reducir la hiperglucemia (ya de por sí proinflamatoria) sino también al

modular a la baja el sistema inmunológico y disminuir la generación de mediadores inflamatorios. Estos hallazgos tienen implicaciones particularmente importantes en enfermedades en las que la señalización de la insulina está desregulada, ya que tales alteraciones podrían promover o inhibir la respuesta inmune. Así, por ejemplo, se postula que en condiciones de **hiperinsulinemia** se hiperactiven linfocitos que provocan una **respuesta inmune inflamatoria** mediada por la vía **Akt/NF-kB**. Esta vía, mediante la producción de citoquinas inflamatorias como TNF- α e IL-6, ayuda a rebajar la respuesta a la propia hiperinsulinemia, ya que, a través de la activación de quinasas celulares (JNK, ERK, PKC) que estas citoquinas promueven, se anularía la señal del InsR y se generaría una resistencia a la insulina. Por tanto, es probable que la respuesta proinflamatoria en condiciones de hiperinsulinemia sea una forma de rebajar la acción insulínica y que **interacciones insulina-células inmunes** relevantes sean el origen de afecciones de la respuesta inmunitaria, incluida la autoinmunidad.

Por otro lado, **STAT3** es un factor de transcripción conocido por estimular las células inmunosupresoras en condiciones inflamatorias crónicas, de modo que actuaría en contrapartida a la vía proinflamatoria incentivada por la activación de NF-kB. STAT3 se puede activar a través de fosforilación tanto por **JAK**, como por **Akt** y **mTORC1** (importantes quinasas de señalización del InsR). A través de la activación de STAT3 en células inmunes, la insulina media en la inmunosupresión, la inmunosenescencia y la resistencia a la insulina. Esta última la desencadena STAT3 al inducir la expresión de SOCS3, que como se expone a continuación, genera una respuesta de retroalimentación negativa a la exposición de insulina.

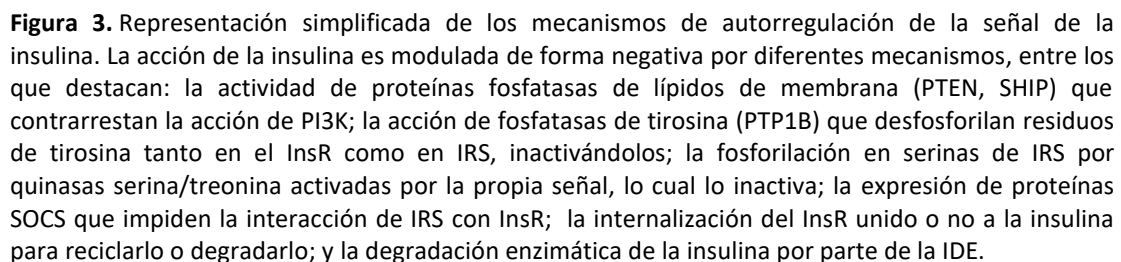
4.1.5. Finalización de la señal del receptor de la insulina

La activación del receptor de la insulina está sujeta a un control por retroalimentación negativa. Esta acción la llevan a cabo, por un lado, un tipo de proteínas fosfatasa específicas, y por otro, una serie de quinasas serina/treonina que se activan durante la propia señalización para generar una respuesta determinada, pero que también promueven fosforilaciones retroinhibidoras que frenan la señalización corriente arriba. El equilibrio entre la estimulación de la vía por fosforilaciones activadoras versus su inhibición por fosfatasa y fosforilaciones inactivantes, garantiza una apropiada sensibilidad a la insulina. Romper este equilibrio puede provocar defectos en su señalización que, como se expone más adelante, pueden llevar a una resistencia insulínica.

Los mecanismos más importantes de control negativo de la señalización del receptor de la insulina se resumen a continuación (91) (Figura 3):

- **Fosfatasa de lípidos fosforilados.** La fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (**PTEN**) hidroliza el fosfato 3 de PIP3, de igual forma, la fosfatasa de fosfatidilinositol que contiene dominio SH2 (**SHIP**) hidroliza el fosfato 5 de esta molécula. Ambas enzimas hidrolizan PIP3 a PIP2. Al disminuir la presencia de PIP3 en membrana, se reduce la actividad de PDK y Akt, disminuyendo así los efectos de la insulina.
- **Fosfatasa de fosfotirosinas.** La actividad de proteínas fosfatasa que actúan sobre tirosinas fosforiladas, como la 1B (**PTP1B**), promueven la defosforilación del InsR y del IRS, con lo que atenúan la respuesta a la insulina.
- **Fosforilación en serinas de IRS.** La fosforilación en algunas serinas específicas del IRS impide su unión tanto al InsR como a la subunidad reguladora de PI3K (p85). Esta fosforilación está inducida por quinasas serina/treonina activadas durante el curso de la propia señalización del InsR, y que, a su vez, actúan como elementos de control negativo de la respuesta a la insulina (PKC, S6K, JNK, ERK).

- Figura 3*



Lo descrito hasta el momento muestra la importancia de un correcto desempeño y autorregulación en la señalización que desencadena la insulina, ya que permite una adecuada transición del estado alimentado al estado de ayuno y viceversa, regulando procesos metabólicos vitales para el organismo. Los moduladores positivos y negativos que actúan en diversos puntos de la vía, así como la interacción de distintas isoformas de proteínas, aseguran

que en los diferentes tejidos se produzca una respuesta biológica a la insulina adecuada y coordinada (90). De hecho, perturbaciones en esta respuesta pueden desembocar en importantes disfuncionalidades metabólicas (90).

La sensibilidad a la insulina en los tejidos diana está regulada fisiológicamente por factores circulantes que incluyen lípidos plasmáticos, hormonas, linfocinas y adipocinas. Los lípidos pueden interferir de forma negativa en la actividad del InsR al activar quinasas serina/treonina que fosforilen al IRS en sus residuos de serina, inactivándolo. Por su parte, las citoquinas mencionadas modulan la respuesta a la insulina a través de sus respectivas vías de señalización. El tejido adiposo, el cerebro, el intestino y en especial el sistema inmune, constituyen un **eje neuroinmunoendocrino** que genera una serie de citoquinas que interactúan con las vías de señalización de la insulina, incidiendo constantemente en la sensibilidad a esta hormona en sus tejidos diana. Cuando este sistema homeostático es desregulado de forma continua, puede causar una inhibición patológica de la respuesta a la insulina al interferir negativamente con la señalización del InsR de forma descontrolada (110).

La **resistencia a la insulina (RI)** es una condición por la cual las células no pueden responder adecuadamente a esta hormona debido a fallos en la señalización de su receptor. Las causas de la resistencia a la insulina son numerosas y complejas, y aún no han sido dilucidadas por completo. Entre estas causas se encuentra una **hiperglucemia** mantenida en el tiempo, lo que conduce a una **hiperinsulinemia**, que a su vez lleva a una **hiperlipidemia** que provoca lipotoxicidad, secreción de adipocinas del tejido adiposo, incretinas del intestino y linfocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos. Las causas de este escenario son numerosas y se deben a complejas interacciones entre el genotipo y el estilo de vida, lo que generalmente conduce a **obesidad** y finalmente al llamado **síndrome metabólico**, aspectos que se tratan más adelante. Por otro lado, las alteraciones en cualquiera de los genes (expresión génica, mutaciones) que codifican las diferentes proteínas que participan en la señalización de la insulina, o el efecto de agentes ambientales (dieta poco saludable, obesidad, estrés, etc.) pueden conllevar el incremento de la actividad de hormonas que dificulten la acción de la insulina. Así, por ejemplo, el estrés genera altos niveles de cortisol y hormona del crecimiento, que a su vez inducen una sobreexpresión de la subunidad p85 de la PI3K que, al competir con el complejo p85-p110 que conforma la PI3K para unirse a IRS, bloquea la señalización del receptor. O en otras situaciones, como al producirse una respuesta inflamatoria, se generan **citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6)**, cuya señalización induce hiperactivación de determinadas quinasas (JNK, ERK, PKC), que precisamente intervienen en el mecanismo de retroalimentación negativa de la señalización del InsR al bloquear el IRS (Figura 3) (90,111). Respecto a este último punto, cabe destacar que las células del sistema inmune (linfocitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos) pueden expresar en mayor o menor medida el InsR en su superficie; de hecho, se ha observado en varios sistemas de experimentación (*in vivo* e *in vitro*) que la insulina es clave para potenciar la respuesta inmune innata (89). Por tanto, no resulta extraño que en una situación de hiperinsulinemia haya una mayor respuesta inmune y que se promueva el inicio de una inflamación crónica. En este escenario, como se acaba de mencionar, la producción de citoquinas como TNF- α o IL-6, que activan las quinasas JNK o PKC, puede ejercer un efecto retroinhibitorio de la actividad de la insulina, atenuando la señalización del InsR en células inmuno-competentes, pero también puede afectar negativamente a otros órganos insulino-sensibles y que expresan el receptor para TNF- α o para IL-6 (hepatocitos, miocitos o adipocitos).

Como se expuso anteriormente, el páncreas genera y secreta insulina como respuesta al aumento de los niveles de glucosa en sangre, por lo tanto, un estado de hiperglucemia obliga al páncreas a generar aún más insulina, lo que puede inducir un estado de retroalimentación negativa continuada que al final aboca a las células dianas a no ser receptivas a esta hormona, generando RI. La vía más afectada es la de IRS/PI3K/Akt, lo que

implica una merma en la respuesta del miocito esquelético y del adipocito para transportar GLUT4 a la superficie celular y, por tanto, para captar glucosa, empeorando la hiperglucemia cada vez más. En este punto, para compensar la ineficacia de la insulina y recuperar los niveles normales de glucosa en sangre, se produce un aumento de la tasa de secreción de insulina por las células β pancreáticas, e incluso, un aumento de la masa de estas células (6); es decir, se combate la ineficacia de la hormona con grandes cantidades de esta. La **hiperinsulinemia** generada por este proceso puede, a su vez, promover desajustes metabólicos que afectan a los tejidos diana, e incluso la respuesta inmune frente a patógenos puede verse afectada (89). Si este estado se mantiene en el tiempo, se alcanza un punto en el que las células β se vuelven incapaces de compensar la resistencia a la insulina al producirse su muerte por apoptosis. Esto se debe a la intensa respuesta de estas células a los aumentos de glucosa, con todo lo que ello conlleva: disfunción mitocondrial por estrés y gran producción de especies reactivas de oxígeno (**ROS**), que a su vez genera estrés del retículo endoplásmico, el cual empieza a producir proteínas mal plegadas (insulina) y aún más ROS. Como consecuencia de estos procesos, se genera una gran citotoxicidad, incapacidad para producir insulina, apoptosis de la célula β y destrucción de los islotes de Langerhans, en definitiva, lo que se denomina como **“agotamiento del páncreas”** (8). A medida que la disfunción de las células β y la resistencia a la insulina se exacerban, la hiperglucemia se amplifica, lo que conduce inexorablemente al desarrollo de **diabetes mellitus tipo 2** (1,6,7,9), una enfermedad que actualmente supone uno de los mayores retos para los sistemas de salud de todo el mundo. Cualquier tratamiento que ayude a reducir este agotamiento pancreático supondría un gran avance en la prevención de la diabetes tipo 2 y en la mejora de la calidad de vida de las personas afectadas.

En el siguiente apartado, se desarrollarán en profundidad las características que definen a la diabetes mellitus, sus tipos, sus causas y consecuencias.

4.2. Diabetes mellitus

4.2.1. Características y causas de la diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM), o simplemente diabetes, es una enfermedad crónica que se caracteriza por la aparición de trastornos heterogéneos en el metabolismo, cuya principal consecuencia es una hiperglucemia sostenida en el tiempo (y los problemas que esta acarrea). La aparición de diabetes se puede deber a que el páncreas ya no es capaz de generar insulina, a que el organismo es incapaz de utilizar adecuadamente esta hormona (resistencia a la insulina), o a ambas (3,4). Como se indica más adelante, esta enfermedad se divide en varios tipos, siendo los principales: diabetes mellitus tipo 1 (**T1DM**), tipo 2 (**T2DM**), gestacional (**GDM**), y otros tipos específicos (como la tipo 3, **T3DM**, propuesta para la resistencia cerebral a la insulina).

Por lo general, un déficit de insulina o la incapacidad de las células (miocitos y adipocitos) para responder apropiadamente a ella, conduce a niveles elevados de glucosa en sangre, por lo que se usa como indicador clínico de diabetes (7). Los criterios más estandarizados para el diagnóstico de la diabetes son los establecidos por la OMS, la FID y la ADA (1,7): glucemia igual o superior a 126 mg/dL en ayunas, o glucemia igual o superior a 200 mg/dL a las 2 horas de una prueba oral de tolerancia a la glucosa (utilizando una carga de glucosa de 75 g disueltos en agua). Hay que destacar que la ADA también incluye la medición de la hemoglobina glicosilada (**HbA1c**) como parte de los criterios de diagnóstico de diabetes y prediabetes, ya que este parámetro permite un mejor rastreo de valores altos de glucosa en sangre durante los 2-3 meses previos al análisis (7,112). Por su parte, la OMS apoya que un valor de HbA1c igual o superior al 6,5% es válido para el diagnóstico de diabetes, pero también hace hincapié en que para el diagnóstico de estados prediabéticos es necesario una medición

de HbA1c con una mínima calidad garantizada, y que esta medición de calidad no se da a escala mundial (1,113).

Aunque la OMS y la FID recomiendan principalmente el uso de una prueba oral de tolerancia a la glucosa, en la que se mida la glucemia en ayunas y tras 2 horas del inicio de la prueba; para la detección de estados prediabéticos puede resultar más útil una medición de glucemia igual o superior a 155 mg/dL tras solo 1 hora del inicio de la prueba, ya que esta medida es altamente predictiva de una progresión a diabetes (114).

4.2.2. Consecuencias de la diabetes mellitus

Cuando el estado de hiperglucemia que produce la diabetes se mantiene en el tiempo, se facilita la aparición de diferentes complicaciones: enfermedades cardiovasculares, neuropatías, daño renal, necesidad de amputación de miembros, infecciones de la piel, úlceras, problemas de huesos y articulaciones, infecciones en dientes y encías, o enfermedades oculares que provocan pérdida de visión e incluso ceguera.

La alta concentración de glucosa circulante de forma continuada trae consigo un incremento de los procesos oxidativos con efectos nefastos en varios órganos. Esto hace que la consecuencia principal asociada a la diabetes sea el aumento del **estrés oxidativo**, involucrado tanto en la patogénesis de la enfermedad como en sus complicaciones a largo plazo. Según Sies H et al., 2007, el estrés oxidativo se puede definir como un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, lo que conduce a una alteración del control y la señalización de las reacciones de reducción-oxidación (redox) en el organismo, pudiendo provocar un daño a nivel molecular importante (115). En condiciones normales del metabolismo fisiológico, y en especial durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria, se produce una serie de subproductos conocidos como especies reactivas de oxígeno (**ROS**), que se forman a partir de la reducción del oxígeno hasta la formación de H₂O al incorporar de forma secuencial 4 electrones. Estos subproductos son el superóxido (O₂⁻), el radical hidroxilo (OH⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La interrupción en alguna etapa de esta secuencia antes de llegar a la formación de agua puede generar acumulación de ROS en la mitocondria. En este momento pueden intervenir enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, o la glutatión peroxidasa, las cuales degradan las ROS derivándolas hacia la formación de H₂O (31). De entre todas las ROS, la más dañina es el radical hidroxilo porque puede reaccionar con las macromoléculas orgánicas (proteínas, lípidos o ADN), oxidándolas y modificando su estructura y función. Pero, normalmente, los antioxidantes presentes en los organismos (vitamina C, vitamina E, vitamina A, glutatión, bilirrubina, etc.) pueden evitar el daño que provocan las macromoléculas oxidadas al devolverlas a su estado reducido cediéndoles 1 electrón y parando una posible reacción en cadena, ya que una molécula oxidada se convierte en sí misma en un radical libre que buscará su equilibrio “robando” un electrón a una molécula vecina (un ejemplo sería la peroxidación lipídica de lípidos de membrana).

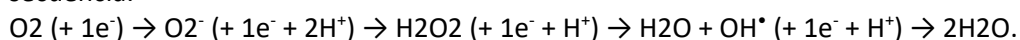
Bajo ciertas circunstancias, las ROS (en especial el radical hidroxilo), se pueden generar en una tasa tan elevada que no puede ser contrarrestada por los mecanismos antioxidantes normales debido a la propia saturación de los mismos. En este escenario, las ROS resultan muy perjudiciales porque al reaccionar con las macromoléculas orgánicas no solo las inutilizan, sino que se convierten en moléculas potencialmente citotóxicas y clastogénicas.

Se ha demostrado que en sujetos con diabetes existe un aumento de la producción de ROS y una disminución de las defensas antioxidantes, y es que cuando los niveles de glucosa se elevan demasiado, se activan otras vías para metabolizarla y estas comparten la característica común de producir altos niveles de ROS (116–118). Además, se ha propuesto que las ROS son la principal causa de disfunción y apoptosis de las células β pancreáticas, relacionada con la

exposición crónica a elevados niveles de glucosa (hiperglucemia) (119), facilitando el desarrollo de diabetes tipo 2.

Existen varios mecanismos que explican como la **hiperglucemia** puede ocasionar **estrés oxidativo** en tejidos cuyas células no dependen preferentemente de la insulina para la entrada de la glucosa, como neuronas, células endoteliales, células renales o células β . Entre estos mecanismos destacan:

- **Aumento de la actividad de la cadena transportadora de electrones.** Altos niveles de glucosa llevan a un aumento de la glucólisis, esto incrementa los niveles de piruvato y su conversión a acetil-CoA, que pasa al ciclo de Krebs para generar electrones que serán transportados por las moléculas NADH y FADH₂ a la cadena respiratoria dentro de la mitocondria para la síntesis de ATP. Esto genera un incremento de la reducción del O₂, que a través de la acción del complejo citocromo c oxidasa funciona como aceptor final de 4 electrones (e⁻) por molécula de O₂, para formar H₂O mediante la secuencia:



Cuando la generación de NADH y FADH₂ es elevada, puede ocurrir que el O₂ presente en la mitocondria acepte electrones directamente de estas moléculas, transformándose en superóxido (O₂⁻) prematuramente (120). Este superóxido formado, si no es interceptado por una enzima antioxidante, difunde hacia otros compartimentos de la célula con relativa facilidad, donde puede transformarse en hidroxilo (que como ya se comentó, es la ROS más peligrosa por su alta reactividad).

- **Autooxidación de la glucosa.** Elevadas concentraciones de glucosa pueden conducir a la autooxidación de esta (**glicoxidación**), formando enediol. Este enediol en presencia de metales de transición, como Fe⁺³, se transforma en compuestos llamados **radicales enediol**, que al interactuar con el O₂ generan una reacción en cadena de ROS facilitando la formación de O₂⁻, OH⁻ y H₂O₂ (121–123).
- **Glicación de proteínas.** Ante una elevada concentración de glucosa, esta puede reaccionar con proteínas en un proceso conocido como glicación de proteínas, formando **productos de Amadori**. Uno de los productos de Amadori más conocido es la hemoglobina glicosilada (**HbA1C**), cuyos niveles en sangre, como se ha mencionado anteriormente, se emplean en la detección y el control de la diabetes. Estos productos pueden degenerar por reacciones de oxidación, degradación, etc. en especies de dos carbonos, los **glioxales**, que son altamente reactivos con macromoléculas formando aductos que anulan la función molecular. Estos son los productos finales de la glicación avanzada (**AGE**), que resultan más estables y peligrosos, pues no solo son macromoléculas anuladas (creando inhibición de actividad proteica o mutaciones), sino que además son reconocidos por receptores específicos de AGE (**RAGE**). Los RAGE se expresan en muchos tipos de células, incluidas neuronas, y su señalización induce la generación de una gran cantidad de ROS que a su vez activan elementos que promueven mecanismos de inflamación con gran repercusión en muchos órganos, siendo esto último el peligro que deriva de la glicación de proteínas (124).
- **Aumento de la actividad de la proteína quinasa C (PKC).** Estados de hiperglucemia en pacientes diabéticos dan lugar a la producción excesiva de diacilglicerol (**DAG**) en la célula, siendo este un activador de las isoformas de PKC (125). Esto lleva a la activación de NADPH y NADH oxidasas, las cuales generan ROS (121,126), y además el aumento de la actividad de estas enzimas se ha relacionado con la disfunción de las células β del páncreas (127). Por otro lado, la producción de DAG también se ve favorecida por la presencia de ROS, retroalimentándose la formación de estos productos (125). Además,

una consecuencia de la activación de las PKC es la fosforilación en serinas del IRS (inactivándolo), contribuyendo a la resistencia a la insulina y exacerbando la misma hiperglucemia.

- **Activación de la vía de los polioles.** En condiciones de hiperglucemia, se potencia la vía de los polioles para reducir los niveles de glucosa. Mediante esta vía, la glucosa se transforma en sorbitol usando NADPH en el proceso, reduciéndose por tanto su disponibilidad para otras enzimas antioxidantes que también lo requieren (118). El sorbitol a su vez puede oxidarse a fructosa, que participa en reacciones de glicación, resultando en la formación de **AGE** y en la producción de ROS.
- **Disminución de antioxidantes.** Los antioxidantes son compuestos químicos que interactúan con los radicales libres (como las ROS) y los neutralizan. Se ha observado que en pacientes diabéticos existen alteraciones en la síntesis y el metabolismo del antioxidante glutatión (GSH), observándose una disminución en sus niveles y en los de enzimas que participan en su biosíntesis, posiblemente debido a perturbaciones en la homeostasis de las reacciones redox (128).

En conjunto, todas estas fuentes de ROS debidas a la hiperglucemia, y la interacción/retroalimentación entre ellas, conducen a la alteración de la estructura y funcionalidad de proteínas, lípidos y ADN, ayudando al desarrollo de diferentes complicaciones para la salud del paciente.

Una prolongada falta de control médico sobre la diabetes puede llegar a causar daño a muchos órganos, lo que se traduce en problemas de salud que pueden ser incapacitantes y, en los peores casos, mortales. Sin embargo, si se lleva a cabo una adecuada supervisión de la enfermedad, acompañada de una mejora en el estilo de vida, estas graves complicaciones pueden retrasarse o incluso prevenirse por completo.

4.2.3. Prevalencia de la diabetes mellitus

La prevalencia y futura proyección de la diabetes a nivel global es preocupante si se atiende a los datos proporcionados en la décima edición del Atlas de la Federación Internacional de la Diabetes (FID) (datos del año 2021) (1): 537 millones de adultos, de entre 20 y 79 años, la padecen (lo que representa el 10,5% de la población mundial en este grupo de edad), y las estimaciones son que para 2030 este dato sea de 643 millones (11,3%), y de 783 millones (12,2%) para 2045. En el caso concreto de España, en 2021 el 10,3% de la población de entre 20 y 79 años padecía diabetes, siendo uno de los países europeos con mayor prevalencia de esta enfermedad (1). A estos datos hay que sumar que, en 2021, a nivel mundial ya había en torno a 541 millones de personas adultas con intolerancia a la glucosa, un estado que es debido a una resistencia a la insulina, y en el que las concentraciones de glucosa plasmática posprandial superan el rango normal, hecho que los coloca en una condición de alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (1).

Cabe destacar que cerca de la mitad de adultos que viven con diabetes (240 millones) no están diagnosticados, y que 3 de cada 4 viven en países de ingresos medios o bajos. En niños y adolescentes (menos de 19 años), las cifras son igualmente preocupantes, ya que en 2021 más de 1,2 millones padecían diabetes tipo 1, y este número aumenta anualmente (1).

Se calcula que el gasto invertido en salud debido a adultos que padecen diabetes fue de 966.000 millones de dólares americanos en 2021, lo que supone un aumento considerable con respecto a años pasados, ya que en 2007 este gasto fue de 232.000 millones. Solamente en España, en el año 2021, el gasto total en salud relacionado con la diabetes en adultos se estimó en 15.500 millones de dólares americanos, siendo uno de los diez países con mayor

gasto debido a esta enfermedad. En última instancia, la diabetes es una enfermedad que puede llegar a ser mortal, de hecho, se estima que causó 6,7 millones de muertes en 2021 (1 cada 5 segundos) (1).

4.2.4. Tipos de diabetes

La diabetes es una enfermedad que se clasifica en varios tipos dependiendo de sus características: las causas que la provoca, los síntomas que desencadena, o la edad de las personas afectadas. Por lo tanto, el tratamiento que se aplica dependerá del diagnóstico. Aunque existen varios tipos de diabetes, los más comunes son la diabetes tipo 1, en la que se produce un defecto en la producción de insulina por parte del páncreas; y sobre todo la diabetes tipo 2, que como se comentó anteriormente, se debe a alteraciones en las vías de señalización del receptor de la insulina que son proclives a generar un agotamiento de las células β (3,4).

4.2.4.1. Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 (T1DM de sus siglas en inglés) es resultado de una reacción autoinmune del organismo, que ataca y destruye a las células β del páncreas encargadas de la producción de insulina. Como consecuencia de este proceso, el organismo produce muy poca o ninguna insulina.

Todavía no se comprenden completamente las causas de esta reacción autoinmune, aunque una posible explicación es que se deba a una combinación entre una predisposición genética (debida a una gran cantidad de genes, siendo un trastorno claramente poligénico, con cerca de 40 loci conocidos que pueden afectar a la susceptibilidad a esta enfermedad (129)) y a un gran abanico de desencadenantes ambientales (130,131), siendo los más estudiados: la dieta durante la infancia y adolescencia (132), deficiencias de vitamina D y/o problemas en su metabolismo (133–135), e infecciones virales (136,137). Sin embargo, aún no se han identificado agentes específicos con una influencia inequívoca en la patogénesis de la diabetes tipo 1, por lo que está creciendo el interés en modelos para describir la influencia del medio ambiente en esta enfermedad, incluyendo el posible efecto de la higiene (138) y de la microbiota intestinal (139).

Aunque la diabetes tipo 1 puede desarrollarse a cualquier edad, se da con más frecuencia en niños y adultos jóvenes (140), siendo una de las enfermedades crónicas más comunes en la infancia.

Los principales síntomas de la T1DM son polidipsia (aumento anormal de la sed), poliuria (micción frecuente) y pérdida de peso, aunque también suelen aparecer otros síntomas como falta de energía, fatiga, apetito constante o visión borrosa (141). Pero este cuadro clínico puede no ser tan claro y en ocasiones el diagnóstico se retrasa o incluso se puede pasar por alto, pudiendo desembocar en una hospitalización por cetoacidosis diabética (el hígado descompone grasa para obtener energía de forma rápida, este proceso genera ácidos llamados cetonas, que, al producirse excesivamente rápido, pueden acumularse hasta llegar a niveles tóxicos).

Las personas que padecen diabetes tipo 1 precisan de una administración diaria de insulina exógena para mantener los niveles de glucosa en sangre dentro de un rango adecuado, ya que no presentan defectos en la señalización del receptor de la insulina y la respuesta a esta hormona es efectiva. Sin estas dosis diarias, los enfermos de T1DM no sobrevivirían; sin embargo, con una monitorización regular de los niveles de glucosa en sangre, el tratamiento adecuado de insulina según estos valores de glucemia y un correcto estilo de

vida, pueden llevar vidas saludables y retrasar o incluso prevenir muchas de las complicaciones asociadas con la diabetes (1).

En el año 2021, había alrededor de 8,4 millones de personas en todo el mundo que padecían T1DM, de estos, 1,5 millones (18%) eran menores de 20 años, 5,4 millones (64%) tenían entre 20 y 59 años y 1,6 millones (19%) tenían 60 años o más (142). Aún con estos datos, la incidencia de la T1DM varía a lo largo del mundo, algunas regiones presentan cifras mucho más altas que otras; pero en general, el número de casos de esta enfermedad ha ido en aumento en la gran mayoría de los países. Aunque recientemente hay evidencias de que este aumento está disminuyendo o ha cesado en algunos países de altos ingresos. Las razones de estas variaciones no están claras, pero factores como los desencadenantes ambientales, las diferencias étnicas, la susceptibilidad genética o la capacidad de los sistemas de salud de los diferentes países para diagnosticar nuevos casos, son explicaciones lógicas (143,144).

4.2.4.2. Diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 o T2DM es el tipo de diabetes más común, ya que la padecen más del 90% de personas con diabetes en todo el mundo (1). Como se adelantó en el apartado 4.1.6. “**Resistencia a la insulina**”, el desarrollo de T2DM viene precedido de una incapacidad de las células del organismo para responder apropiadamente a la insulina. Al volverse la hormona menos eficaz, se obliga al páncreas a aumentar su producción para mantener la estabilidad en el organismo, y si esta condición se mantiene en el tiempo, se puede producir un agotamiento de las células β pancreáticas. De esta forma aparece la T2DM, en un escenario en el que el páncreas produce una insuficiente cantidad de insulina ya de por sí ineficiente, lo que deriva en un estado de hiperglucemia incontrolado (1,6,7).

Antes de llegar a padecer T2DM suelen aparecer otras condiciones como la **intolerancia a la glucosa** o la **glucosa alterada en ayunas**, en las que los niveles de glucosa en sangre están por encima del rango normal pero no llegan al umbral de diagnóstico de diabetes. A estos estados también se les suele conocer como prediabetes, hiperglucemia no diabética o hiperglucemia intermedia (6,113,145). Detectar de forma temprana cuadros prediabéticos se vuelve fundamental por varios motivos, principalmente porque conllevan un alto riesgo de desarrollar T2DM (6,146,147), pero también indican un riesgo elevado de padecer enfermedades cardiovasculares (ECV) (148,149), además de que su pronta detección aumenta las posibilidades de prevención de futuras complicaciones (150). Se estima que, tras 5 años desde el diagnóstico, la progresión desde intolerancia a la glucosa a T2DM tiene una incidencia acumulada del 26%, mientras que este dato es del 50% en el caso de padecer glucosa alterada en ayunas (147). La progresión desde prediabetes a T2DM no solo está vinculada a tener altos niveles de glucosa en sangre, ya que como se detallará más adelante, existen otros factores de riesgo como la edad y el sobrepeso (151).

Los síntomas de la T2DM son muy similares a los de la T1DM, pero generalmente estos suelen ser de menor intensidad e incluso, en algunos casos, los pacientes pueden ser completamente asintomáticos en las primeras etapas de la enfermedad. Además, en muchas ocasiones los afectados suelen padecer estados prediabéticos durante largos periodos de tiempo antes de desarrollar T2DM, por lo que no se puede saber con exactitud el momento concreto del inicio de la enfermedad. Como resultado, es muy frecuente que transcurra mucho tiempo hasta que se diagnostica, y se estima que entre un tercio y la mitad de las personas con T2DM puede estar sin diagnosticar (1). Si el diagnóstico, y por tanto la intervención médica, se retrasa demasiado, pueden llegar a aparecer complicaciones derivadas. Entre las más frecuentes destacan: problemas de visión, úlceras en miembros inferiores que cicatrizan mal, enfermedades cardíacas o accidentes cerebrovasculares. En muchos casos es la aparición de estas complicaciones el indicio que lleva al diagnóstico de la diabetes que subyace (152,153).

Las causas de la T2DM no se comprenden por completo, pero al igual que con T1DM, se cree que son un conjunto de desencadenantes poligénicos y ambientales; el aumento de la edad, el origen étnico, los antecedentes familiares, un estilo de vida sedentario, un consumo de dietas poco saludables con grandes cantidades de bebidas azucaradas, y sobre todo el **sobrepeso** y la **obesidad**, presentan un fuerte vínculo con la aparición de T2DM (1,10). El exceso de grasa en el organismo, evaluado por un IMC alto, es el factor de riesgo individual más fuerte para el desarrollo de T2DM (10,11) y está asociado con muchas anormalidades metabólicas que resultan en resistencia a la insulina (12). Tanto la obesidad abdominal (evaluada por la circunferencia de la cintura o por el índice cintura-cadera), el aumento de peso desde la edad adulta temprana (que se produce de forma frecuente y gradual durante la etapa media de la vida), como la adiposidad visceral son predictores del riesgo de padecer T2DM (154–156).

En cualquier caso, la mejor manera de prevenir (y controlar) la T2DM es llevar un estilo de vida que incluya una dieta equilibrada, actividad física regular, no fumar y mantener un peso corporal saludable (157). Si los intentos de cambiar el estilo de vida no son suficientes para controlar los niveles de glucosa en sangre, generalmente se inicia la medicación oral, con **metformina** como medicamento de primera línea (1). La metformina es un fármaco perteneciente al grupo de las biguanidas, su administración es segura, rentable y presenta buenos resultados cuando se combina con dieta y ejercicio. Entre los mecanismos de acción de este medicamento se encuentran una disminución de la resistencia a la insulina en el hígado, cambios en el metabolismo de los ácidos biliares, liberación de incretinas, disminución de los depósitos de amiloide y disminución de los niveles de glucosa en sangre (158); también hay estudios que señalan una posible asociación entre la metformina y la disminución del riesgo de cáncer, aunque se necesita más ensayos clínicos para probar este beneficio (158–161). Aunque la metformina sea el fármaco de primera opción para el tratamiento de la T2DM, aún no se conoce en profundidad como consigue modular el metabolismo de la glucosa, recientes estudios han identificado el intestino como un objetivo potencial y dado que los pacientes con trastornos metabólicos presentan disbiosis (desequilibrio en la microbiota intestinal), se está investigando la relación entre la T2DM, la microbiota intestinal y la acción de la metformina (162).

Cuando el tratamiento con un solo medicamento antidiabético no es suficiente para controlar los niveles de glucosa en sangre, se suele comenzar una terapia combinada con diferentes fármacos, como pueden ser (1,163):

- **Sulfonilureas:** actúan mediante su unión al canal de K⁺ específico situado en la membrana de la célula β. Esta unión provocará el cierre del canal de K⁺ (normalmente dependiente de la concentración de ATP), lo que lleva a una despolarización de la membrana celular, favoreciendo la entrada de Ca²⁺ hacia el citoplasma y la posterior exocitosis insulínica. Para su actuación, las sulfonilureas precisan de una cierta integridad funcional del páncreas, ya que aumentan la liberación de la insulina preformada, pero no estimulan su biosíntesis (164).
- **Inhibidores de la alfa glucosidasa (como la acarbosa):** al inhibir esta enzima, se logra retardar la hidrólisis de los hidratos de carbono de cadena larga y con ello se alcanza una reducción de los picos glucémicos posprandiales (165).
- **Tiazolidinedionas (como la pioglitazona y la rosiglitazona):** mejoran la sensibilidad a la insulina principalmente en tejido adiposo, hígado y músculo. Su mecanismo de acción se basa en la activación de PPAR-γ, lo que lleva a la expresión de proteínas específicas que regulan el metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos, y además provoca un aumento de la acción de la insulina a nivel celular (166).

- **Inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP4):** inhiben la enzima que degrada a GLP-1, haciendo que este se acumule y se mantenga más tiempo en el organismo. Como ya se describió, GLP-1 es una incretina que favorece la producción y secreción de insulina por parte de las células β (167).
- **Agonistas del receptor de GLP-1:** imitan la acción de GLP-1, desencadenando sus efectos sobre la producción y la secreción de insulina. Algunos ejemplos pueden ser: Liraglutida (Saxenda), Dulaglutida (Trulicity) o Semaglutida (Ozempic). En la actualidad su rango de actuación se ha extendido hacia el agonismo simultáneo del receptor de GIP (Tirzepatida y CagriSema) y el triple agonista de glucagón/GIP/GLP-1 (Retatrutida).
- **Inhibidores del cotransportador de sodio/glucosa 2:** inhiben la reabsorción de glucosa en el riñón, eliminando la cantidad sobrante a través de la orina, y ejerciendo por tanto un efecto hipoglucemiante (168).

Aunque estos fármacos pueden cumplir su papel para disminuir los niveles de glucosa en sangre, también existe una preocupación sobre los posibles efectos no deseados que pueden acarrear, como una hipoglucemia descontrolada, o el aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (163). Si el uso de estas sustancias (o una combinación de ellas) no consigue regular la glucemia, puede ser necesario la administración de inyecciones de insulina exógena, ajustando la dosis para compensar la disminución de producción de insulina del paciente, hasta el punto de superar la resistencia a esta hormona y reducir la glucemia.

Por sus características, la T2DM afecta principalmente a adultos, pero progresivamente también se está convirtiendo en una preocupación en niños y jóvenes, principalmente como consecuencia del aumento de casos de sobrepeso y obesidad en estos grupos (169,170). Sin embargo, a pesar de la relación entre obesidad y T2DM, algunas poblaciones que tienen una baja prevalencia de obesidad infantil, como en Asia oriental, presentan tasas de incidencia más altas de T2DM en jóvenes en comparación con poblaciones con una mayor carga de obesidad infantil (1,171,172). La predisposición genética, diferencias de estatus socioeconómico, el acceso a asistencia sanitaria o las prácticas culturales entre personas de diferentes países u orígenes étnicos pueden contribuir a las diferencias en el riesgo de sufrir T2DM que tienen los jóvenes (1,173,174). Hay que remarcar que se necesitan más estudios que ahonden en este grupo poblacional, ya que la incidencia y la prevalencia mundial de la T2DM en niños y adolescentes varían sustancialmente entre países, categorías de edad y grupos étnicos (175); posiblemente debido a diferencias en las metodologías utilizadas y la calidad general de las observaciones publicadas (1). También señalar que, en comparación con los jóvenes que padecen T1DM, los jóvenes con T2DM tienen más probabilidades de desarrollar otros factores de riesgo cardiometabólicos, como presión arterial alta, triglicéridos elevados u obesidad central (176). Además, como se verá más adelante, los adultos jóvenes que padecen T2DM, es decir, personas que se encuentran en los años de mayor eficacia reproductiva, aumentan el riesgo intergeneracional de aparición temprana de T2DM en sus descendientes.

4.2.4.3. Diabetes tipo 3

Actualmente se está desarrollando un interés cada vez mayor en aclarar el papel de la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia, la T2DM y la enzima degradadora de la insulina en la patogénesis de la **enfermedad de Alzheimer** (EA), así como en las lesiones citoesqueléticas neuronales y en los depósitos de péptido β -amiloide ($A\beta$), los cuales son sellos distintivos de la EA (177).

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo y limitante, asociado a diferentes lesiones neuropatológicas y moleculares, que actualmente no tiene cura (177,178). Estas

anomalías cerebrales llevan a un deterioro de la cognición, la función y el comportamiento, que generalmente comienza con la pérdida de memoria de eventos recientes, pero que en etapas avanzadas puede provocar complicaciones derivadas que terminen con la muerte del paciente (179). La EA es un trastorno complejo y multifactorial que está determinado por la interacción entre la susceptibilidad genética y los factores ambientales a lo largo de la vida. La edad, los antecedentes familiares de EA, la herencia genética, la obesidad, la T2DM o el abuso de dietas ricas en grasas saturadas, son importantes factores de riesgo para esta enfermedad (179,180).

La evidencia científica básica sugiere una posible fisiopatología compartida entre la T2DM y la EA, incluso, diferentes autores han propuesto que la EA sea una consecuencia específica de un tipo de diabetes que involucra selectivamente al cerebro, ya que ambas dolencias tienen características moleculares y bioquímicas que se superponen. De esta forma nace la hipótesis de que la EA podría ser resultado de una diabetes clasificada como tipo 3 (66,177,181–183).

En un cerebro sano, la señalización de la insulina participa en distintas funciones como neuromodulación, función cognitiva, o reparación y diferenciación neuronal. En cambio, estudios realizados en cerebros con EA demuestran que en esta enfermedad existen condiciones de resistencia cerebral a la insulina e hiperinsulinemia, condiciones que pueden provocar un **aumento de los depósitos de A β** y una **hiperfosforilación de la proteína tau** (180).

En condiciones normales, la proteína tau es fosforilada y desfosforilada constantemente para regular el ensamblaje de los microtúbulos, siendo GSK-3 una de las quinasas que la fosforilan. Pero en situaciones de resistencia cerebral a la insulina, la señalización de esta hormona está truncada, haciendo que GSK-3 no se inhiba por Akt y por lo tanto hiperfosforile a tau; en este estado, tau tiende a agregarse formando ovillos neurofibrilares que están relacionados con pérdida sináptica y muerte neuronal, provocando deterioro cognitivo (180,184).

Los altos niveles de insulina en el cerebro, debidos a una resistencia a esta, pueden provocar la formación de depósitos de A β a través de dos mecanismos: por un lado, la activación de la vía de las MAPK, y por otro la actividad predominante de la enzima degradadora de la insulina (IDE) para la eliminación de esta hormona (180). Como su nombre indica, la IDE degrada insulina, pero también otros péptidos como A β , por lo que una actividad sesgada hacia la eliminación de insulina provoca un bloqueo o déficit en la degradación de A β , produciéndose su depósito y precipitación en áreas extracelulares del cerebro. Grandes depósitos de A β pueden dar lugar a la formación de placas seniles, lo que induce una respuesta inflamatoria a través de la activación astrogliar y microglial, provocando degeneración sináptica y, en consecuencia, disfunción cognitiva (180,185). Resulta interesante, a la vez que revelador, la observación reciente de que el número de depósitos de A β no se correlaciona directamente con el grado de deterioro cognitivo, de hecho, existen pacientes que presentan muchos depósitos de A β y no tienen síntomas de EA (185). Estas observaciones ponen en entredicho una creencia firmemente asentada: la vinculación entre el desarrollo de placas amiloideas en el tejido cerebral y la manifestación clínica de demencia de tipo Alzheimer; poniendo ahora el foco en la hiperfosforilación de la proteína tau y su asociación con la aparición de deterioro cognitivo (186).

En definitiva, la estrecha relación entre diabetes y EA, y cómo la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia favorecen la aparición de depósitos de A β y de ovillos neurofibrilares, ha llevado a una corriente de pensamiento que cataloga la EA como la manifestación de una diabetes cerebral clasificada como diabetes tipo 3.

4.2.4.4. Hiperglucemia en el embarazo. Diabetes gestacional

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (187,188), estados de hiperglucemia en madres gestantes es una de las afecciones médicas más comunes durante el embarazo. Se estima que 21,1 millones de mujeres que tuvieron un parto en 2021 sufrieron algún tipo de hiperglucemia durante el embarazo. De estos, el 80,3% se debieron a diabetes gestacional (**GDM**: Gestational Diabetes Mellitus); el 10,6% fueron el resultado de una diabetes diagnosticada antes del embarazo (diabetes pregestacional); y el 9,1% fue debido a una diabetes (principalmente tipo 1 y tipo 2) que se diagnosticó por primera vez en el embarazo, pero que posiblemente ya estaba presente en la mujer con anterioridad a este (1,187–192). Como muestran los datos, la principal causa de desarrollar hiperglucemia en el embarazo es la aparición de diabetes gestacional.

Es necesario conocer que a medida que avanza un embarazo corriente, se produce un incremento de la producción de hormonas locales y placentarias como progesterona, leptina, cortisol, lactógeno placentario u hormona del crecimiento placentario, todas ellas oponentes de la acción de la insulina; haciendo que se desarrolle un entorno anti-insulínico en la madre, sobre todo a partir del tercer trimestre de embarazo (193). Como consecuencia, se fomenta una resistencia a la insulina fisiológica por parte materna y la concentración de glucosa en sangre aumenta (hiperglucemia transitoria). El transporte de glucosa a través de la placenta es muy eficaz, de manera que se favorece un gradiente de glucosa circulante desde la madre hacia el feto. De esta forma se satisfacen las necesidades de glucosa del feto, que son mayores en las últimas semanas de gestación coincidiendo con el aumento del cerebro fetal. Pero como contrapartida, los niveles de glucosa materna caen rápidamente en ayunas, y aunque el organismo materno debe satisfacer la alta demanda de glucosa del feto, también debe mantener su propia homeostasis. Para esto último la madre recurre al glucógeno y al glicerol hepático como sustratos gluconeogénicos.

Además de promover un ambiente de resistencia insulínica materna durante un embarazo saludable, las hormonas placentarias son responsables, a la vez, de inducir la hiperplasia e hipertrofia de las células β pancreáticas de la madre, con resultado de un aumento en la secreción de insulina estimulada por la glucosa, contrarrestando el desplazamiento excesivo de glucosa al feto (193).

El equilibrio entre la resistencia a la insulina materna y el aumento de la masa y la actividad de las células β , garantiza un suministro óptimo de glucosa al feto y una glucemia controlada en la madre. La GDM aparece cuando este equilibrio se ve alterado como consecuencia de un suministro de insulina insuficiente para compensar la resistencia a esta hormona (193). Tanto el deterioro de las células β , como una excesiva resistencia tisular a la insulina son componentes críticos para la aparición de GDM, y terminan por dar lugar a una hiperglucemia durante el embarazo (193). Tras el parto no se espera que la GDM persista, ya que el organismo de la madre recupera la capacidad de regular correctamente la glucemia al desaparecer el entorno anti-insulínico que genera el embarazo (191).

Los criterios para el diagnóstico de la GDM han variado durante el tiempo y siguen siendo controvertidos, además raramente aparecen síntomas evidentes derivados de la hiperglucemia y pueden ser difíciles de distinguir de los síntomas normales del embarazo. La inclinación hacia los criterios de diagnóstico defendidos por la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo (IADPSG) / OMS (194), ha llevado a un aumento en la prevalencia general de la GDM (195,196). Lo habitual, es someter a la mujer embarazada a una GTT de forma oral, midiendo la concentración de glucosa en sangre en ayunas, así como 1 y 2 horas después de ingerir 75 gramos de glucosa. Para diagnosticar GDM, se debe igualar o superar uno o más de los siguientes valores: 92 mg/dL en ayunas, 180 mg/dL 1 hora después de la ingesta y 153 mg/dL 2 horas después de la ingesta. Estos umbrales están actualmente

recomendados en todo el mundo, y representan la mejor opción desde una perspectiva clínica y epidemiológica (194).

Los factores de riesgo que pueden influir en la aparición de GDM incluyen una edad avanzada, sobrepeso u obesidad, haber padecido diabetes gestacional en un embarazo anterior, aumento excesivo de peso durante el embarazo, antecedentes familiares de diabetes, síndrome de ovario poliquístico, o tabaquismo; además, la GDM es más común en algunos grupos étnicos (1,196).

Las mujeres que sufren GDM, o en general hiperglucemia durante el embarazo, tienen un mayor riesgo de presentar complicaciones, como pueden ser presión arterial alta o que el bebé desarrolle un tamaño mucho mayor al promedio para su edad gestacional (macrosomía, que puede dificultar el parto) (197). Una identificación temprana de la hiperglucemia combinada con un buen control de la glucosa en sangre durante el embarazo, puede reducir significativamente estos riesgos. Asimismo, los bebés nacidos de madres con diabetes tienen mayores posibilidades de padecer obesidad y desarrollar diabetes tipo 2 a lo largo de su vida (198).

Las mujeres que ya están diagnosticadas con algún tipo de diabetes antes de quedar embarazadas deben extremar las precauciones: asesoramiento médico antes y durante el embarazo, control de la medicación, seguimiento intensivo de la diabetes, etc. Pero, en cualquier caso, las mujeres con hiperglucemia durante el embarazo pueden contribuir a controlar sus niveles de glucosa en sangre a través de una dieta saludable, control de su peso corporal, ejercicio moderado y un monitoreo regular de la glucemia. La interacción con los profesionales de la salud es importante para apoyar su autocontrol y también para identificar la necesidad de una intervención médica u obstétrica (1).

4.2.4.5. Otros tipos de diabetes

Según un informe de la OMS sobre la clasificación de la diabetes mellitus (1,199), existen otros tipos de diabetes que presentan una baja prevalencia y que, aunque puedan compartir algunos rasgos con tipos de diabetes más comunes (como la hiperglucemia), presentan ciertas características que las enmarcan en categorías diferentes. De acuerdo con la clasificación que hace la OMS, existen:

- Diabetes monogénicas, que como indica su nombre, son trastornos en los que se produce hiperglucemia como resultado de las alteraciones fisiopatológicas provocadas por la mutación de un único gen, en lugar de la contribución de múltiples genes y factores ambientales (200,201). Algunas de sus variantes más frecuentes son la diabetes neonatal, enfermedades sindrómicas raras asociadas a la diabetes o las denominadas MODY (del inglés *Maturity Onset Diabetes of the Young*, diabetes que se comporta como la enfermedad del adulto, pero que se presenta en el individuo joven) (202).
- Diabetes causada por enfermedades del páncreas, como pueden ser pancreatitis, traumatismo, infección, cáncer de páncreas o pancreatectomía.
- Diabetes debida a trastornos endocrinos que provocan una secreción excesiva de hormonas que antagonizan a la insulina (p. ej. síndrome de Cushing).
- Diabetes inducida por fármacos o productos químicos que interfieren con la secreción de insulina o con la acción de esta.
- Diabetes causada por una infección viral asociada con la destrucción de las células β .

- Formas poco frecuentes de diabetes inmunomediada (p. ej. trastornos inmunológicos distintos de los que causan la diabetes tipo 1).
- Otros síndromes genéticos con algún tipo de asociación con la diabetes, como pueden ser el síndrome de Prader-Willi, el síndrome de Down, la ataxia de Friedreich, etc.

Los casos de diagnóstico de diabetes que no se pueden clasificar en ninguna de las categorías descritas se suelen designar como “diabetes no clasificada”, aunque suele ser de forma temporal hasta que van aflorando todas sus características.

4.3. Sobrepeso y obesidad

El sobrepeso y la obesidad son condiciones definidas por la OMS como una acumulación anormal o excesiva de grasa que presenta un riesgo para la salud (203). Un índice de masa corporal (IMC) superior a 25 se considera sobrepeso y superior a 30, obesidad; también existen otros indicadores de sobrepeso y obesidad como son la circunferencia de la cintura, la ratio cintura/cadera y/o el porcentaje de tejido graso (204).

La obesidad es una enfermedad multifactorial crónica que se caracteriza por una excesiva acumulación de lípidos en el tejido adiposo y en sitios ectópicos como el músculo esquelético y el hígado; es causada por la interacción entre factores ambientales y predisposición genética, que lleva a un balance energético positivo en el que la ingesta de calorías supera el gasto (13). Por su simplicidad, el IMC es el principal indicador de obesidad y sobrepeso, pero este no mide de forma directa el nivel de grasa corporal, por lo que puede darse el caso de que una persona tenga sobrepeso (pesa más de lo que se considera normal para su altura, edad y sexo), pero no presente una excesiva cantidad de grasa. Aun con esta consideración, la medida del IMC está correlacionada con medidas más directas de la grasa corporal, además de estar fuertemente relacionada con problemas de salud que sí se asocian a una excesiva acumulación de grasa (205–209).

4.3.1. Causas de la obesidad

Es importante señalar que, en muchas sociedades, la obesidad no se reconoce como una enfermedad sino como un fracaso personal, sin tener en cuenta la gran importancia que tiene la genética de cada individuo en el desarrollo de esta condición, además de la educación nutricional y física, circunstancia social y costumbres locales gastronómicas.

El principal encargado de acumular energía en el organismo es el tejido adiposo, ya que lo hace de forma más eficiente: la grasa contiene aproximadamente 9 kcal/g, mientras que carbohidratos o proteínas presentan alrededor de 4 kcal/g (210). Por tanto, las grasas son esenciales ya que permiten mantener la estabilidad al disponer de energía en situaciones de gran necesidad energética o falta de alimentos. Aun teniendo en cuenta este hecho, el ser humano presenta una mayor tendencia a acumular grasa que sus parientes evolutivos. Concretamente, mientras que otras especies de primates, en la naturaleza, tienen <9% de grasa subcutánea, en humanos sanos este porcentaje puede variar entre el 14% y el 31% (dependiendo de factores como la edad o el sexo) (211). Aunque se sabe poco sobre la evolución del tejido adiposo en primates, un creciente conjunto de evidencias sugiere que, debido a cambios epigenéticos transmitidos durante la evolución, los humanos hemos desarrollado una tendencia a presentar mayores cantidades de grasa corporal para satisfacer las altas necesidades energéticas de un cerebro de gran tamaño (211). Y es que las neuronas dependen casi exclusivamente del metabolismo de la glucosa para generar energía (212), así que el género Homo desarrolló la capacidad de mantener un ejercicio físico de forma prolongada a través del metabolismo aeróbico, usando la grasa como fuente de energía y

preservando la glucosa para el cerebro (213,214). De hecho, el humano es el único primate con la capacidad de correr distancias de varios kilómetros manteniendo cierta velocidad (carrera de persistencia) (213). Este mecanismo resultó en una gran ventaja evolutiva para poder gestionar el gran consumo de glucosa que necesita un cerebro tan grande, y además permitir al cuerpo realizar esfuerzos mantenidos en el tiempo consumiendo preferentemente ácidos grasos para ello.

Si bien esta forma de almacenamiento de energía resulta muy útil en estilos de vida de cazadores/recolectores, se puede volver perjudicial para la salud en los ambientes obesogénicos actuales (215).

Un **ambiente obesogénico** se define como la suma de influencias presentes en el entorno, las oportunidades o las condiciones de vida, que ayudan a promover la obesidad en individuos o poblaciones (216); es decir, un ambiente que es contraproducente para llevar una nutrición saludable y realizar actividad física frecuente. Hoy en día, en muchas sociedades se han desarrollado entornos donde domina la ingesta de alimentos de alta densidad energética (generalmente baratos y fácilmente disponibles), mientras que se reducen las oportunidades para estar activo físicamente, en consecuencia, la población sufre un excesivo aumento del tejido graso que se traduce en aumento de peso (69,217,218). Por lo que se puede afirmar que la obesidad no es una cuestión de fracaso personal, sino un estado desarrollado en respuesta a un entorno obesogénico, que puede llegar a ser perjudicial para la salud si se cronifica o exacerba.

En muchas sociedades, sufrir obesidad acarrea un estigma que puede dañar el bienestar mental y físico, e incluso impedir que las personas busquen la atención médica necesaria. Aunque este estigma varía entre culturas y su alcance es diferente para cada persona, queda claro que sufrir discriminación por el peso no ayuda a las personas a adoptar estilos de vida más saludables (219).

La proliferación de ambientes obesogénicos y, por lo tanto, el aumento de casos de personas obesas entre la población mundial, se puede atribuir a cambios multifactoriales en la economía, la demografía, la epidemiología, los hábitos alimentarios y los patrones de actividad física (219). Aunque estos factores (y la interacción entre ellos) pueden ser muy variados, diversos autores coinciden en que entre las principales causas de obesidad se encuentran:

- **Estilo de vida sedentario.** Es innegable que realizar actividad física con regularidad tiene importantes beneficios sobre la salud. De hecho, la prolongada inactividad física, además de aumentar el riesgo de obesidad, también aumenta el riesgo de padecer cáncer, enfermedades cardíacas, accidentes cerebrovasculares y diabetes en un 20-30%, asimismo acorta la esperanza de vida en un promedio de tres a cinco años (218–222).
- **Dietas y hábitos poco saludables.** Cambios en los sistemas alimentarios mundiales han facilitado que entre las poblaciones aumente el consumo de productos ultraprocesados con un alto contenido de carbohidratos refinados, azúcares y grasas saturadas. Los alimentos ultraprocesados se han vuelto más disponibles y menos costosos en comparación con los alimentos frescos ricos en nutrientes. En muchos países, estos alimentos constituyen más del 50% del total de calorías consumidas por niños diariamente, y hay que destacar que una dieta saludable sigue siendo inasequible para el 41,9% de la población mundial. Por otro lado, hábitos nocivos como fumar, beber alcohol o presentar una mala calidad del sueño (de corta duración, sueño tardío o falta de sueño), también son importantes factores de riesgo para desarrollar obesidad (218,219,221,223–226).

- **Predisposición genética.** El desarrollo de la obesidad tiene una evidente contribución ambiental, pero estimaciones de heredabilidad del 40 al 70% muestran la importancia de la susceptibilidad genética en esta enfermedad. Una parte de la población muestra una propensión genética a desarrollar obesidad, y esta propensión se puede ver exacerbada por influencias ambientales y conductuales (218,219,227–229).
- **Estatus socioeconómico.** Muchos estudios elaborados con datos de países desarrollados han demostrado que un nivel socioeconómico más alto está asociado con un menor riesgo de obesidad. Las personas en grupos socioeconómicos más altos tienden a tener una dieta más saludable, caracterizada por un mayor consumo de frutas, verduras y leches bajas en grasas, y en general un menor consumo de grasas. Sin embargo, también hay estudios que demuestran que en otras regiones (como países en África subsahariana o Sudáfrica), el aumento del nivel socioeconómico se asocia con un mayor riesgo de obesidad; estos son países en vías de desarrollo donde se da un cuadro complejo en relación al estado nutricional de la población, y donde existen importantes diferencias en el comportamiento de la población con respecto a países desarrollados. También hay que destacar que la atención médica puede suponer altos costos para los pacientes de obesidad, por lo que un nivel bajo de ingresos implica una barrera para la prevención y el tratamiento de esta enfermedad (218,219,230–233). Por otro lado, muchas empresas productoras y distribuidoras de alimentos han desarrollado un marketing social moderno con un impacto sustancial en las preferencias y hábitos alimentarios en las últimas décadas. Muchos de los productos alimenticios que se comercializan tienden a ser ricos en energía y pobres en nutrientes, a menudo dirigidos a grupos vulnerables, como niños, adolescentes (y adultos jóvenes), así como personas de bajo nivel socioeconómico. Los factores económicos brindan incentivos para que las empresas se decanten por entornos alimentarios en los que es cada vez más difícil acceder y permitirse una dieta saludable (219,234).

Además de los ya expuestos existen otros factores de riesgo para el desarrollo de obesidad, como pueden ser el sexo, la edad, el nivel educativo, la presencia de enfermedades previas (o el consumo de fármacos para el tratamiento de estas dolencias), el estrés, la depresión, o las características de la comunidad (sociedad, cultura e influencia familiar) (224,228,230,235–237).

Si se pretende actuar para atajar el aumento de casos de obesidad, se debe abordar todas sus causas fundamentales y la relación entre ellas; la prevención, el tratamiento y el manejo de esta enfermedad se vuelven ineficaces si se simplifica a una sola causa concreta. Hay que tener presente que muchos de los factores de riesgo para padecer obesidad salen del territorio tradicional de la intervención médica, por lo que se hace necesario un enfoque multidisciplinar (219).

4.3.2. Consecuencias de la obesidad

Padecer obesidad tiene importantes consecuencias sobre la salud, ya que aumenta el riesgo (y puede ser la causa subyacente) de aparición de dolencias como enfermedades cardiovasculares, enfermedades hepáticas, ciertos tipos de cáncer, y está íntimamente ligada con la aparición de T2DM; además de suponer un estigma social que aumenta el riesgo de sufrir problemas psicológicos, emocionales y sociales (219). Presentar un IMC elevado y una excesiva acumulación de grasa corporal son un importante predictor de futuros trastornos metabólicos (238,239).

Si se da durante el embarazo, la obesidad puede conducir a resultados neonatales adversos: lesión del músculo esquelético, síndrome de dificultad respiratoria, daño en el sistema nervioso periférico, sepsis bacteriana, convulsiones o hipoglucemia, y, además aumenta la tasa de cesáreas y la morbilidad entre las mujeres (238,240–243).

Como se comentó anteriormente, además de su relación con T2DM, la obesidad está asociada con una variedad de comorbilidades (238) entre las que se encuentran: dislipemia e hipertensión (244), enfermedad cardiovascular, apnea obstructiva del sueño y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (245), cáncer (246–249), fibrilación auricular (250); y también aumenta la morbilidad, la mortalidad y los casos de muerte prematura (245,251). La obesidad presenta una alta correlación con sufrir lesión renal e incontinencia urinaria (245,252), y en mujeres también se relaciona con el síndrome de ovario poliquístico (PCOS, de sus siglas en inglés) (253). Además de lo ya descrito, la obesidad presenta conexión con otros tipos de problemas, como bajada en el rendimiento académico debido al estigma que supone el aumento de peso (254), comorbilidades mentales (255), o disfunción sexual (256).

Por último, decir que el impacto y las consecuencias de la obesidad varían para cada paciente según los rasgos biológicos, los antecedentes de enfermedad, el entorno en el que se desarrolla, o las medidas que se toman para atajarla.

4.3.3. Prevalencia de la obesidad

Los datos obtenidos por la Federación Mundial de Obesidad (*World Obesity Federation, WOS*) y recogidos en el *World Obesity Atlas 2023* (2), muestran la alarmante prevalencia que presenta la obesidad y la tendencia a aumentar en los próximos años. Según estos datos, en el año 2020, el número de personas (mayores de 5 años) que presentaban un IMC igual o superior a 25, era de 2.603 millones (38% de la población mundial), de estos, 988 millones (14% de la población mundial) padecían obesidad ($\text{IMC} \geq 30$). Para el año 2035 se espera que el número de personas (mayores de 5 años) con un IMC igual o superior a 25, sea de 4.005 millones (51%), y de estos, 1.914 millones (24%) sufra obesidad. Como se citó al inicio, en España, en torno al 27% de adultos presentaba obesidad en 2020, esperándose un aumento para 2035 hasta alcanzar alrededor del 37%.

Se vuelve a destacar que entre niños y adolescentes (de 5 a 19 años), la obesidad presenta un problema cada vez más preocupante, ya que, en el año 2020, en este grupo de población existían 175 millones de personas con obesidad, y la tendencia es que este dato sea de 383 millones para 2035 (2).

Ningún país ha reportado una disminución en la prevalencia de la obesidad en su población, y ninguno está en camino de cumplir con el objetivo de la OMS de “no aumentar los niveles de obesidad de 2010 a 2025” (2).

La prevalencia de la obesidad está aumentando más rápidamente en países de ingresos bajos y medios, de forma similar al panorama global que se observa para la T2DM. Muchos de estos países están sufriendo de forma simultánea la carga de la obesidad y la desnutrición (2,219,257). La rápida urbanización y el cambio hacia estilos de vida occidentales, son dos de las numerosas causas que impulsan el aumento en la prevalencia de la obesidad en estas regiones (219).

Si bien la prevención y el tratamiento de la obesidad requieren una importante inversión financiera, el impacto económico de no actuar será mucho mayor. Los efectos sobre la economía incluyen tanto los costos de atención médica para el tratamiento de la obesidad y sus consecuencias, como el impacto de esta enfermedad en la productividad económica (aumento del ausentismo, reducción de la productividad en el trabajo y jubilación o muerte

prematuras). Se estima que, en 2020, el impacto económico global de presentar un IMC ≥ 25 fue de 1,96 billones de dólares americanos, y las estimaciones son de 4,32 billones de dólares americanos para 2035 (2). En el caso particular de España, en 2020 este impacto económico fue estimado en 29.784 millones de dólares americanos, y se espera que esta cifra aumente hasta 43.915 millones para 2035 (2).

4.3.4. Relación entre diabetes tipo 2 y obesidad

Como ya se ha visto, existe una clara relación entre la T2DM y la obesidad, siendo la obesidad un importante factor de riesgo para desarrollar diabetes, generalmente a través de un periodo prolongado de resistencia a la insulina. Se estima que una persona obesa tiene un riesgo siete veces mayor de desarrollar T2DM que una persona que presente un peso saludable (258).

No obstante, la relación entre estas dos enfermedades no es uniforme en las diferentes poblaciones mundiales (219), ya que, a nivel mundial, la obesidad es responsable de alrededor del 43% de los casos de T2DM (219,259–262), pero en algunos países, como en Estados Unidos o Reino Unido, la T2DM es debida a la obesidad aproximadamente en el 80-90% de los casos (219,263,264), y sin embargo, en otras regiones (como en muchos países asiáticos), existe un gran número de personas que desarrolla T2DM sin presentar previamente obesidad (265). La clave en este último escenario parece ser un déficit en la capacidad de secreción de insulina (insulinopenia) más que por una resistencia a la misma, y las causas pueden estar relacionadas con alcoholismo, tabaquismo, pancreatitis o defectos genéticos que pueden afectar, por ejemplo, al canal Kir6.2 de potasio de las células β (265).

La relación entre estas dos enfermedades es compleja y no solo se reduce a que la obesidad es un importante factor de riesgo para la aparición de T2DM, sino que el caso contrario también puede darse, es decir, que la **T2DM produzca obesidad**. Las personas que están genéticamente predispuestas a desarrollar diabetes tienen un alto riesgo de desarrollar obesidad debido a la inherente resistencia a la insulina de sus células musculares y células alfa pancreáticas, lo que se traduce en una mayor producción de glucosa hepática y en un aumento de los niveles de insulina. El resultado de una mayor disponibilidad de glucosa e insulina es una mayor producción y almacenamiento de grasa, lo que favorece el desarrollo de la obesidad (14).

La T2DM y la obesidad se han convertido en dos pandemias interconectadas, un fenómeno conocido como sindemia, es decir, dos pandemias que coexisten en el tiempo y el lugar, interactúan entre sí produciendo complejas secuelas y que son condicionadas por circunstancias sociales, políticas y económicas comunes (219,266). **Diabesidad** es otro término utilizado por algunos autores para referirse a esta pandemia en la que se produce la coexistencia de diabetes y obesidad (267).

La pandemia de diabesidad supone ya un gran (y cada vez mayor) problema de salud pública, primero por todos los trastornos relacionados que implican un empeoramiento de la calidad de vida (y en los peores casos pudiendo llegar a la muerte del paciente), pero también porque conlleva un impacto económico significativo en las personas, los sistemas de salud y los países, además de las consecuencias sociales que pueda acarrear (como el aumento de las desigualdades socioeconómicas) (219).

4.4. El problema de los edulcorantes artificiales

Desde una perspectiva evolutiva, el **sabor dulce** se asocia con alimentos que son una importante fuente de energía, y es que, entre las principales funciones de los carbohidratos (muchos de sabor dulce) se encuentran proporcionar energía inmediata, o almacenar esta

energía en forma de grasa para poder sobrevivir a periodos de déficit de alimento o realizar ejercicios prolongados. De esta forma, el sabor de las comidas y bebidas influye en la conducta alimentaria de las personas y en el deseo de consumir determinados productos, y por lo tanto también se relaciona con la cantidad de calorías consumidas. En periodos de abundancia de alimento, esta predilección por sabores dulces puede llevar a un excesivo contenido de carbohidratos en la dieta, que a su vez puede aumentar el riesgo de desarrollar obesidad, diabetes u otros desordenes metabólicos (268). El sabor dulce se origina en un receptor de gusto (heterodímero TAS1R2/TAS1R3) que se localiza no solamente en la cavidad orofaríngea, sino también en el intestino delgado, donde es capaz de regular la liberación de hormonas gastrointestinales, produciendo efectos postingestivos (269). Estos receptores, además de carbohidratos, también reconocen edulcorantes artificiales (269) (sustancias cuyas características se desarrollarán más adelante).

Entre los carbohidratos que aportan sabor dulce se puede destacar a la sacarosa (α -D-Glucopiranosil - (1 $\rightarrow$ 2) - β -D-Fructofuranósido), un disacárido formado por glucosa y fructosa, que se encuentra omnipresente en las plantas (especialmente en la caña de azúcar y en la remolacha azucarera) y que también es conocida comúnmente como azúcar de mesa, ya que es de los endulzantes más usados en alimentos (270,271). Como edulcorante de uso común, la sacarosa juega un papel indispensable en la dieta de la mayoría de la población, pero su ingesta produce un rápido aumento de los niveles de glucosa en sangre, lo que hace que su relación con la salud sea un tema de amplio estudio. El consumo excesivo de sacarosa está asociado con problemas de salud como caries dental, obesidad, T2DM y enfermedades cardiovasculares (270,272–275).

El metabolismo de la fructosa en humanos es diferente al de la glucosa, ya que es independiente de la insulina, se fosforila a un ritmo más rápido, y se metaboliza principalmente en el hígado (276–278). En las últimas décadas también ha aumentado el consumo de fructosa en muchos países, y no solo por su presencia en la sacarosa, sino como parte del llamado “jarabe de maíz alto en fructosa” (HFCS, de sus siglas en inglés *high-fructose corn syrup*), normalmente usado para la elaboración de una enorme cantidad de productos alimenticios. En principio, la fructosa presenta la ventaja de tener un mayor poder endulzante que la glucosa, y un índice glucémico menor (276,279). Por definición, el **índice glucémico** establece la glucemia en sangre después de haber ingerido un alimento que contenga 50 g de carbohidratos tras un ayuno nocturno, tomando medidas de la glucemia a intervalos de tiempo hasta un máximo de 120-180 min tras la ingesta. Tales medidas se comparan con las que produzca la ingesta de glucosa (50 g) como alimento de referencia o patrón, cuya área bajo la curva glucémica se establece en un valor de 100 unidades. El cociente entre áreas bajo la curva asociadas a otros alimentos con respecto al de la glucosa refleja el valor numérico del índice glucémico de dichos alimentos, e indica la rapidez con la que un alimento con carbohidratos incrementa la glucosa en sangre teniendo como referencia a la glucosa sola.

Debido a estas características, el uso de la fructosa como principal endulzante en los alimentos fue recomendado para personas con diabetes en la década de los años 70, ya que serviría como medida para el control de la glucemia (278). Sin embargo, esta recomendación fue posteriormente desaprobada, ya que como se verá a continuación, el consumo de fructosa también puede presentar importantes efectos negativos sobre la salud. Un alto contenido de fructosa en los alimentos procesados se ha identificado como una fuente de daño metabólico, especialmente para el hígado (280,281), también se ha comprobado que el metabolismo de la fructosa afecta especialmente a la producción de ácido úrico, la lipogénesis de *novo*, la gluconeogénesis, la integridad de la barrera intestinal y al eje intestino-hígado, a su vez, todas estas alteraciones favorecen el desarrollo de hígado graso no alcohólico, obesidad, dislipemia, resistencia a la insulina, y eventualmente aumentan el riesgo cardiovascular (280–284).

Con todo lo descrito, es evidente que lo más recomendable es reducir el exceso de fructosa y glucosa en la dieta actual de países desarrollados, por lo que se hace necesario explorar alternativas a la sacarosa y a los endulzantes con alto contenido en fructosa, que entre sus características presenten un dulzor adecuado, beneficios fisiológicos y procesos de producción viables.

Los **edulcorantes artificiales** surgieron como esta alternativa. Son sustancias químicas con muy poco o ningún aporte calórico, que se agregan a algunos alimentos y bebidas para darles un sabor dulce, similar al de la sacarosa, pero su dulzor puede llegar a ser del orden de cientos a miles de veces mayor al de esta (15). Por este motivo, aunque algunos de estos edulcorantes contienen calorías, la cantidad necesaria para endulzar los productos es tan pequeña que las calorías consumidas son prácticamente despreciables. Entre los principales edulcorantes artificiales se encuentran: acesulfamo de potasio, aspartamo, neotame, sacarina o sucralosa (15).

Los edulcorantes artificiales se han convertido en populares sustitutivos al azúcar de mesa y su uso cada vez es mayor. El aumento de la incidencia de la obesidad y la diabetes, sumado a una mayor sensibilización de la población con respecto a estas dolencias, ha llevado a un cambio en el consumo de alimentos de sabor dulce, encaminándolo hacia un mayor uso de edulcorantes artificiales bajos en calorías. Estos edulcorantes artificiales ya no solo se añaden a comidas y bebidas, sino también a productos dietéticos, medicamentos e incluso enjuagues bucales (285).

Sin embargo, cada vez aparecen más autores y estudios que muestran otra cara de los edulcorantes artificiales, y es que su consumo rápido y generalizado entre la población no se ha visto acompañado por una notable reducción en el problema de la diabetes, y, de hecho, múltiples estudios han demostrado que los edulcorantes artificiales no calóricos no contribuyen ni a mejorar la resistencia a la insulina ni a reducir el peso corporal (16–18). A esto hay que añadir la creciente controversia sobre la seguridad de estas sustancias, ya que posiblemente su consumo excesivo y prolongado tenga consecuencias no deseadas sobre la salud (19–22). Existen indicios de una posible asociación directa entre un mayor consumo de edulcorantes artificiales (especialmente aspartamo, acesulfamo de potasio y sucralosa) y un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (23). Además de que también se han relacionado con un mayor riesgo de sufrir hipertensión (24), inflamación (25), o disfunción vascular (26,27), que son a su vez marcadores tempranos de problemas cardiovasculares (23). De igual forma, existen estudios que indican que los edulcorantes artificiales no calóricos podrían afectar al microbioma del intestino y alterar la barrera intestinal, pudiendo producir disbiosis de la microbiota (28–30); se ha descubierto que producen alteraciones en el eje intestino-cerebro (afectando al apetito y a la modulación de la liberación de insulina) (21,286); su consumo durante el embarazo tiene potenciales efectos transgeneracionales (algo probado en modelos preclínicos, por lo que se necesita más investigación en humanos) y hacen que durante la etapa adulta de la descendencia aumente el riesgo de sufrir obesidad y resistencia a la insulina (287,288); y han sido debatidos sus potenciales efectos cancerígenos, aunque las revisiones sistemáticas no son concluyentes en este aspecto (289).

Los edulcorantes artificiales están presentes en miles de marcas de alimentos y bebidas en todo el mundo, por lo que los riesgos a largo plazo que plantea su consumo es un tema a tener en cuenta y, de hecho, actualmente están siendo reevaluados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, la OMS y otras agencias de salud (23). Por tanto, desde esta perspectiva, y sin tener todavía evidencias claras de los riesgos que acarrearán para la salud, los edulcorantes artificiales no son la solución para la pandemia de diabetes (290).

Con este bagaje se vuelve al punto de partida: ¿cómo controlar los efectos no deseados de los carbohidratos en la dieta, mientras se brinda un sabor apetecible y dulce a los

alimentos?, y tal vez la respuesta **no se encuentre en sustituir los azúcares naturales por edulcorantes artificiales no calóricos**, ya que, no se puede olvidar que el organismo cuenta con sistemas de detección optimizados para estos azúcares, lo que lleva a una respuesta fisiológica adecuada. Por ejemplo, son los azúcares naturales (y no los edulcorantes artificiales) los que provocan una adecuada respuesta intestinal-cerebral tras su ingesta (291,292). Por lo tanto, se debe reconsiderar el uso de los propios mecanismos fisiológicos del organismo para lograr el objetivo de mantener un **equilibrio metabólico saludable mientras se conserva la palatabilidad**.

El consumo de un alimento que presenta hidratos de carbono en su composición es saludable siempre y cuando la cantidad de su ingesta sea la adecuada para evitar que la transformación a ácidos grasos durante su catabolismo sea excesiva, y se logre mantener un nivel glucémico recomendable. Esto evitaría el desmesurado aumento del tejido adiposo y con ello el del peso corporal, así como la aparición de resistencia a la insulina. Este proceso se puede potenciar mediante el consumo de alimentos que incorporen ingredientes funcionales capaces de mejorar el metabolismo de los carbohidratos, y un buen ejemplo de estos ingredientes funcionales son los **inositoles**.

4.5. Inositoles

4.5.1. Estructura

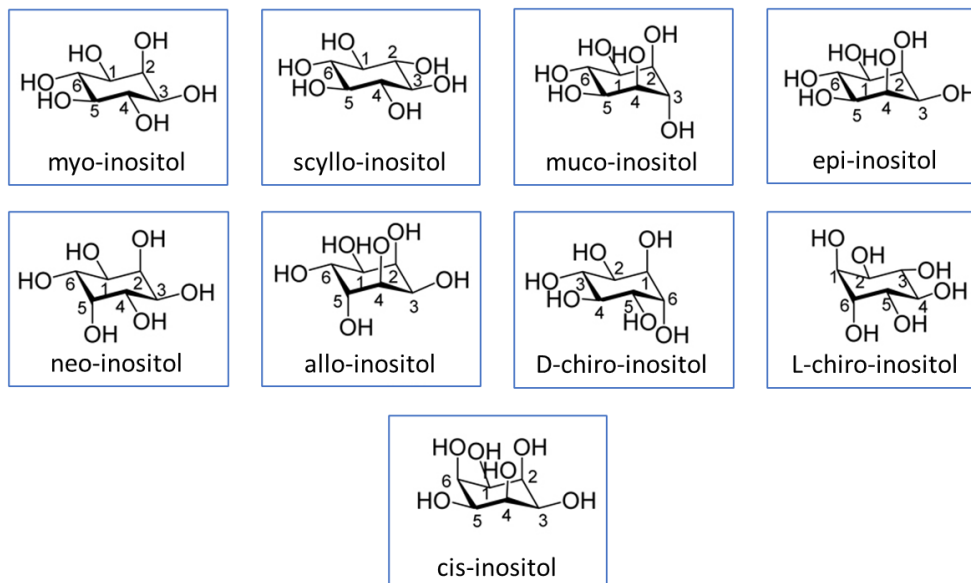
En los últimos años los inositoles y sus derivados están siendo objeto de cada vez más estudios, si bien históricamente el centro de los análisis ha sido el myo-inositol (uno de los estereoisómeros de inositol más abundante y presente en todas las células eucariotas) (32,293), al ampliar el foco hacia otros inositoles se han encontrado interesantes funciones y aplicaciones de estas sustancias.

Los inositoles son compuestos orgánicos similares a los monosacáridos, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y presentan una estructura cíclica de seis carbonos y seis alcoholes, por esto se clasifican como alcoholes de azúcar (polioles con un grupo hidroxilo unido a cada átomo de carbono). Además, tanto los inositoles como los **derivados metilados** de inositoles también son clasificados como ciclitales (cicloalcanos que contienen al menos tres grupos hidroxilo, cada uno unido a un átomo de carbono diferente del anillo) (31).

Según su estructura, en la naturaleza se pueden encontrar ocho estereoisómeros de inositol: myo-, scyllo-, muco-, epi-, neo-, allo-, D-chiro- y L-chiro-inositol; también existe un estereoisómero que no se da de forma natural, el cis-inositol. En la Figura 4A se representa la estructura de todos ellos. Muchos extractos de plantas también contienen derivados metilados de inositoles, como pueden ser el D-Pinitol (3-O-metil-D-chiro-inositol), el D-Ononitol (4-O-metil-myo-inositol), el Sequoyitol (5-O-metil-myo-inositol) o el L-Quebrachitol (2-O-metil-L-chiro-inositol); la estructura de estos derivados se representa en la Figura 4B (31).

Figura 4

A)



B)

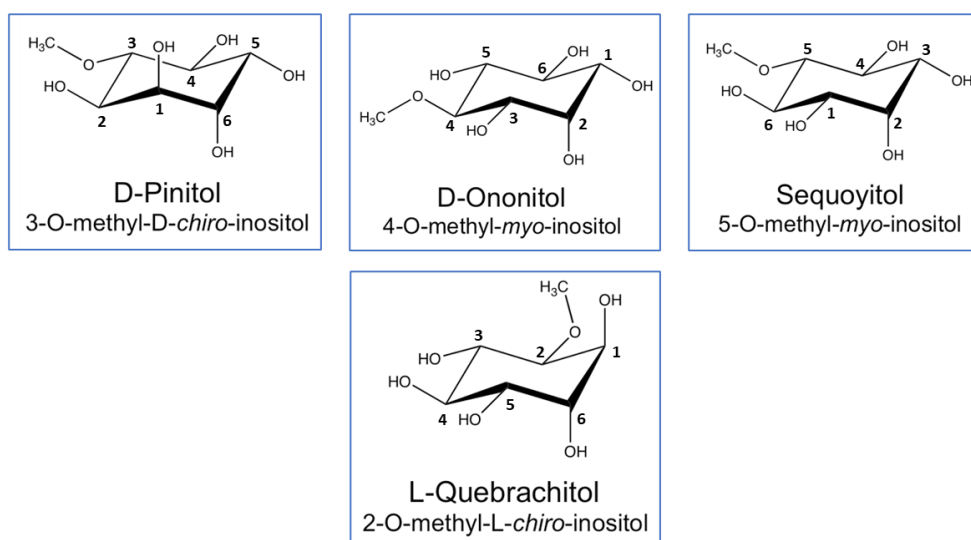


Figura 4. A) Estructuras que presentan los diferentes estereoisómeros de inositol. **B)** Derivados metilados de inositoles. Para cada variante se muestra una estructura tridimensional en la conformación de silla, que no es necesariamente la estructura más estable. También se muestra la numeración de los carbonos en el anillo. Adaptado de Thomas MP et al., 2016 (32) y Fenili D et al., 2011 (294).

4.5.2. Presencia de inositoles en organismos

Como se menciona anteriormente, ocho de los nueve posibles estereoisómeros de inositol ocurren de forma natural, encontrándose en concentraciones variables en tejidos de diferentes plantas (incluyendo derivados de ellos) (32). El myo-inositol (**MI**; cis-1,2,3,5-trans-4,6-ciclohexanohehexol), el scyllo-inositol (**SI**; cis-1,3,5-trans-2,4,6-ciclohexanohehexol), y el D-chiro-inositol (**DCI**; cis-1,2,4-trans-3,5,6-ciclohexanohehexol) se han detectado como los principales inositoles presentes en bacterias y en los tejidos de mamíferos (31). Algunos estudios han reportado la posible presencia de neo-inositol (**NI**; cis-1,2,3-trans-4-5-6-ciclohexanohehexol) en cerebros bovinos (31,295), así como de epi-inositol (**EI**; cis-1-trans-2,3,4,5,6-ciclohexanohehexol) y de muco-inositol (**MUI**; cis-1,4-trans-2,3,5,6-ciclohexanohehexol) en

el hígado, músculo, sangre, cerebro y otros tejidos de rata, con una tasa de isomerización a partir de MI del 0,6% (31,296).

MI y SI son los estereoisómeros más abundantes en los organismos y representan más del 90% del contenido total de inositol en las células de los mamíferos (31). El SI se puede incorporar a los lípidos en plantas (297), sin embargo, no lo hace en niveles detectables en tejidos de mamíferos (incluso tras administración exógena) (298), donde actúa principalmente como osmolito. A su vez, el MI se encuentra principalmente formando parte de la membrana celular y se puede convertir en otros inositoles a través de una epimerasa específica (296,299), la cual difiere de la epimerasa que cataliza la conversión de MI a DCI (300,301). El DCI es otro inositol que se encuentra en abundancia en tejidos de mamíferos, y que actúa como segundo mensajero para la señalización de la insulina, acción que se describe con más detalle más adelante.

4.5.2.1. Obtención e incorporación de inositoles

Ya que los inositoles son muy abundantes en la membrana celular de plantas y animales, se pueden obtener fácilmente a través de la dieta, se estima que la dieta occidental puede proporcionar aproximadamente 0,5-1 g por día de MI (33,34).

La forma más común de incorporación de inositol es el MI libre o en forma de hexafosfato de (myo)-inositol, **IP6** (1,2,3,4,5,6-hexailo hexakis (dihidrogeno (fosfato))), también conocido como **ácido fítico** (Figura 5), siendo las plantas las principales fuentes. El IP6 es un importante reservorio de fósforo, energía y una fuente de cationes y MI; sin embargo, el IP6 no se puede obtener de forma directa de fuentes dietéticas porque su biodisponibilidad es muy limitada. Esto es debido a que presenta una densidad de carga negativa, siendo necesario su desfosforilación a través de fitasas y fosfatasa bacterianas, proporcionando así MI u otras formas de fosfato de inositol antes de entrar al torrente sanguíneo (31,302,303); los únicos animales que pueden llevar a cabo esta transformación pertenecen al grupo de los mamíferos rumiantes.

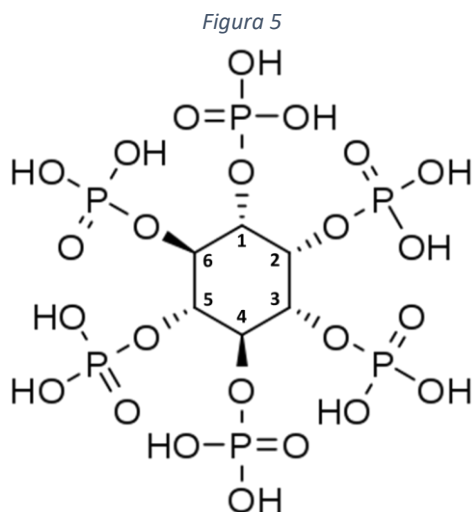


Figura 5. Estructura del ácido fítico, hexafosfato de (myo)-inositol o IP6 (1,2,3,4,5,6-hexailo hexakis (dihidrogeno (fosfato))). Se muestra la numeración de los carbonos en el anillo.

Otro inositol que se incorpora a través de la dieta es el DCI, obteniéndose principalmente a partir de su forma metilada, el **D-Pinitol** (3-O-metil-D-chiro-inositol), que sufre un proceso de desmetilación en el tracto gastrointestinal debido a las condiciones ácidas y da lugar al DCI. Más adelante se estudiará con mayor profundidad al D-Pinitol, un inositol abundante en varios tipos de plantas, especialmente en la familia de las leguminosas, y en

concreto en las vainas del algarrobo (*Ceratonia siliqua*) (31,304); actuando principalmente como osmolito (mejora la tolerancia a diferentes tensiones del ambiente) (31,305). El aporte de otros inositoles a través de la dieta parece ser escaso, como lo demuestra su baja presencia en los organismos.

Además de su incorporación a través de la dieta, varios tejidos de mamíferos como los testículos, las glándulas mamarias, el cerebro, el hígado y principalmente los riñones, también pueden sintetizar inositol a partir de glucosa. Se ha estimado que un riñón humano puede generar aproximadamente 2 g de inositol (MI) por día (4 g en total contando ambos riñones) (306).

El proceso de síntesis de *nov*o de MI se produce en el citosol celular a partir de glucosa, que se fosforila a glucosa-6-fosfato (G6P) a través de una hexoquinasa. La molécula de G6P es convertida en myo-inositol-3-fosfato (Ins3P1) a través de una reacción de isomerización catalizada por la myo-inositol-3-fosfato sintasa (MIPS), en un último paso, la molécula de Ins3P1 es desfosforilada por la inositol monofosfatasa (IMPase) para producir MI libre (Figura 6) (41,307). El MI es el sustrato para la síntesis de fosfatidilinositol, y como se expuso anteriormente, también puede convertirse en otros inositoles a través de la acción de epimerasas específicas.

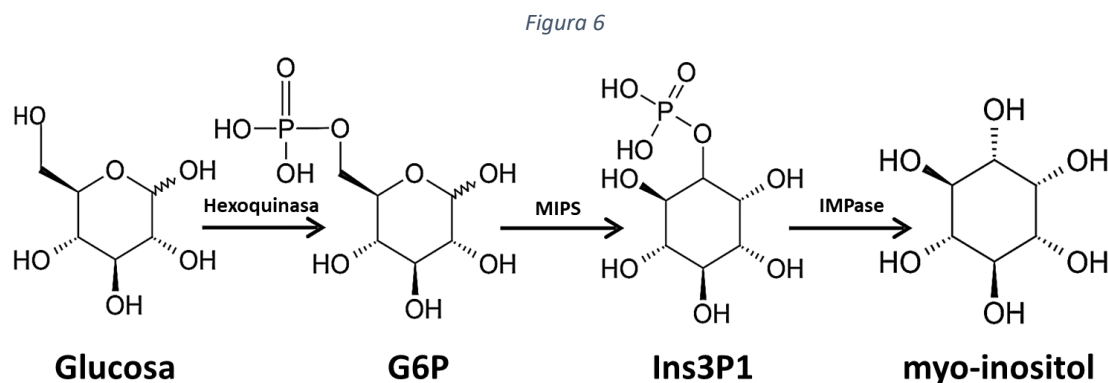


Figura 6. Proceso de biosíntesis de myo-inositol a partir de glucosa. G6P: glucosa-6-fosfato; MIPS: myo-inositol-3-fosfato sintasa; Ins3P1: myo-inositol-3-fosfato, IMPase: inositol monofosfatasa. Adaptado de Sánchez-Hidalgo M et al., 2021 (41).

La entrada de inositol, especialmente MI, en las células de mamíferos puede ocurrir a través de dos tipos de cotransportadores, diferenciados por la naturaleza de los cationes cotransportados: sodio (**SMIT**) o protones (**HMIT**) (Figura 7) (308).

Existen dos simportadores sodio/inositol: **SMIT1** y **SMIT2**, que cotransportan con una relación estequiométrica de 2 Na⁺ a 1 MI, similar a la del cotransportador de sodio/glucosa SGLT1 (309–311). SMIT2 se expresa en gran medida en los riñones de los mamíferos y es responsable de la reabsorción de inositoles al torrente sanguíneo (31). Estos cotransportadores presentan una afinidad diferente para cada estereoisómero de inositol; en el caso de MI y DCI la afinidad es similar y se transportan de forma eficaz a través de SMIT2. El MI también es transportado con gran afinidad por SMIT1 (cosa que no ocurre con el DCI). Por su parte, el SI presenta una gran afinidad por ambos cotransportadores, pero otros derivados de inositol como el D-Pinitol, el Sequoyitol, o el D-Ononitol se transportan con menor afinidad y, de hecho, en el caso del D-Pinitol actúa como un competidor para el transporte de MI y DCI (31,57,294).

SMIT pertenece a la familia de cotransportadores de sodio/glucosa, lo que implica cierta afinidad por la glucosa, aunque esta es menor a la que presenta por los inositoles (312). SMIT2 tiene una mayor afinidad por la D-glucosa que SMIT1, y exhibe estereoespecificidad,

teniendo afinidad por D-glucosa, pero no por L-glucosa. SMIT1, por el contrario, no distingue entre D- y L-glucosa (57,312,313). Aun con esto, no queda claro si SMIT puede trasladar glucosa al interior celular (57,308), dado que la glucosa es transportada por varias proteínas de membrana específicas (familias GLUT1-13 y SGLT1-3), el transporte adicional debido a SMIT es difícil de comprobar. No obstante, las investigaciones parecen indicar que SMIT funciona como transportador de inositol, no de glucosa (57,308). Pero, aunque no se internalice, la glucosa puede competir por los sitios de unión de SMIT en la superficie celular, dificultando el transporte de inositoles (57,294).

Por otro lado, la insulina también puede afectar a la captación de inositoles: el transporte de DCI a través de SMIT2 aumenta en presencia de insulina en mioblastos L6 humanos, y se ha demostrado que la administración de insulina aumentó el contenido muscular de DCI en sujetos sanos, pero no en aquellos con T2DM, lo que podría explicar la menor recaptación de DCI en los conductos renales en casos de hiperglucemia y resistencia a la insulina (31,57,314,315). Además, se ha descubierto una disminución en la actividad de las epimerasas que convierten el MI a DCI y viceversa en estudios con ratas diabéticas (301). Todo esto puede ser el origen del metabolismo anormal del DCI observado en afecciones como la diabetes, la resistencia a la insulina o el síndrome de ovario poliquístico (57).

El hecho de que el transporte de inositol se vea afectado por la concentración de glucosa y por la señalización de la insulina, hace que el efecto de una posible administración de inositoles dependa de diversos factores como: perfil metabólico del usuario, momento de la administración, cantidad administrada, número de dosis, asociación con alimentos, etc. (31).

Además de SMIT1 y SMIT2, los inositoles también pueden ser introducidos en la célula en contra de su gradiente a través del transportador acoplado a protones **HMIT** (H^+ /myo-inositol), con una proporción estequiométrica de 1 H^+ a 1 myo-inositol (35,309). HMIT presenta una distribución en los tejidos mucho más restringida que los transportadores SMIT, encontrándose principalmente en varias regiones del cerebro, ya que está presente en la mayoría de los astrocitos y en algunas neuronas (incluyendo neuronas de la corteza prefrontal y del hipocampo) (35,316). En rata también se ha detectado la presencia de HMIT, en niveles muy bajos, en tejido adiposo (blanco, pardo y epididimal), así como en el riñón (35); pero no existen muchos datos sobre el papel fisiológico de HMIT en el transporte de inositol en los tejidos periféricos. La actividad de HMIT depende del pH, ya que la captación de inositol solo parece darse en condiciones extracelulares ácidas, asociadas con una corriente eléctrica hacia el interior de la célula y una disminución del pH intracelular (316). HMIT puede transportar myo-, scyllo-, D-chiro- y muco-inositol, pero no allo-inositol, y es bloqueado por la floretina y la florizina, que son inhibidores bien descritos de los transportadores de sodio/glucosa SGLT1 y SGLT2 (31).

Figura 7

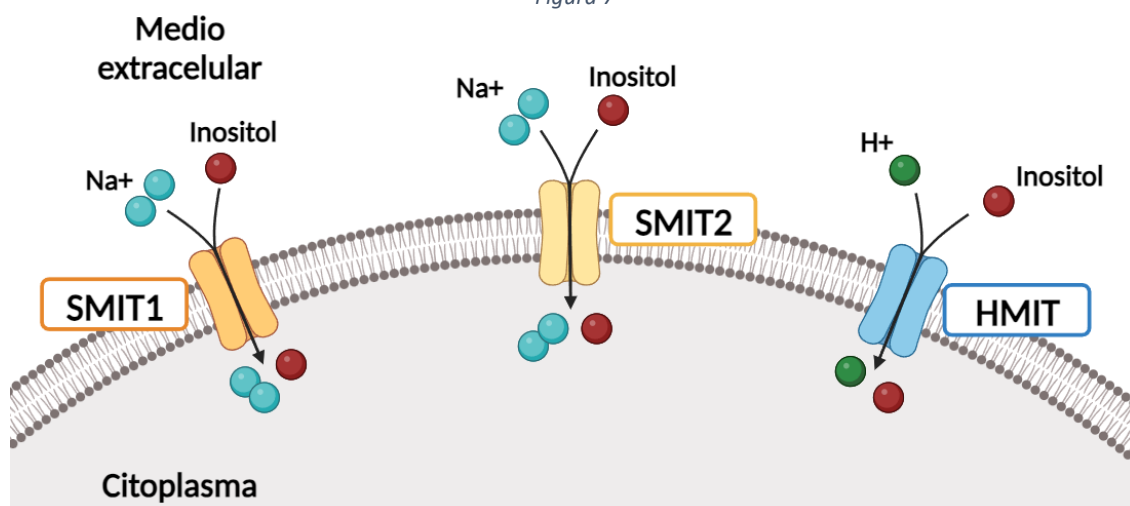


Figura 7. Transportadores de inositoles que pueden presentar las células de mamíferos. Se han identificado tres tipos de transportadores que aparecen en diferente proporción dependiendo del tejido: SMIT1 y SMIT2 cotransportan sodio/inositol con una relación estequiométrica de 2 Na⁺ a 1 inositol; y HMIT cotransporta protones/inositol con una proporción de 1 H⁺ a 1 inositol. Figura creada usando las herramientas y representaciones disponibles en BioRender.com.

Como se acaba de desarrollar, el transporte de inositoles es controlado de manera eficiente, permitiendo que estos participen como osmolitos en el control del equilibrio de electrolitos clave, protegiendo del choque osmótico. Asimismo, intervienen en diferentes vías de señalización (como se describirá más adelante), además de en la endocitosis/exocitosis vesicular (35).

4.5.3. Propiedades fisiológicas de los inositoles y sus derivados

Los inositoles por sí mismos juegan un rol imprescindible en el organismo, pero su función la realizan fundamentalmente como constituyentes esenciales de fosfolípidos complejos de la membrana plasmática (fosfatidilinositoles, glicosilfosfatidilinositoles, inositol fosfoglicanos y derivados) que, además de su función estructural, participan en rutas metabólicas como segundos mensajeros. A continuación, se describe su composición y función en la célula.

4.5.3.1. Los fosfatidilinositoles (PI)

Los fosfatidilinositoles (**PI**) comprenden una familia de fosfolípidos que contienen un inositol (principalmente myo-inositol) conectado a un diacilglicerol (**DAG**) a través de un enlace fosfodiéster en la posición C-1, dejando hasta cinco grupos hidroxilo libres en el anillo de inositol (317,318) (Figura 8A). Constituyen entre el 10 y el 15% del total de lípidos presentes en células de mamíferos (319), siendo uno de los principales **componentes de las membranas** de la célula. El inositol conforma la cabeza polar hidrofílica, y queda expuesto hacia la superficie extracelular o hacia el interior citoplásmico dependiendo de la cara de la membrana en la que se encuentre el PI. Cuando el MI está disponible en la célula, se incorpora a PI, y a partir de este se derivan todos los fosfolípidos que contienen MI (31) (Figura 8B).

Los PIs se distribuyen de manera bastante uniforme entre las membranas de una célula, exceptuando una concentración considerablemente más baja en las membranas internas mitocondriales (319,320). Por lo tanto, la mayor parte de los PIs se encuentra en la membrana plasmática y en la red de membranas que constituye el retículo endoplasmático, el sistema de membranas más extenso de la célula. Y es también en el retículo endoplasmático

donde se produce la síntesis de PI mediante una vía de dos pasos: en primer lugar, las citidina difosfato diacilglicerol sintasas (CDS1 y/o CDS2 en mamíferos) convierten el ácido fosfatídico en citidina difosfato diacilglicerol (CDP-DAG), y después la PI sintasa (PIS) transfiere un grupo fosfatidil desde CDP-DAG al grupo D-1-hidroxilo del inositol (320) (Figura 9). Tanto CDS1/2, como PIS son proteínas integrales de la membrana del retículo endoplasmático que tienen sus sitios activos orientados hacia el citoplasma (320). La PIS tiene una afinidad relativamente baja por el inositol, por lo que el principal factor que controla la tasa de síntesis de PIs es la concentración de inositol libre citosólico, en lugar de cualquier regulación de la actividad intrínseca de PIS (320). Después de su síntesis, algunos PIs se canalizan hacia la cara luminal del retículo endoplasmático para ser incorporados a estructuras de glicano, lo que formará los conocidos como “anclajes GPI” o glicosilfosfatidilinositoles, que serán transportados hasta la membrana plasmática y servirán para unir muchas proteínas a la superficie externa de esta (320); se estudiará estos anclajes GPI con más detalle en próximos apartados.

Los PIs pueden ser sustrato de PI quinasas capaces de fosforilar diferentes posiciones del anillo de inositol, concretamente la 3, 4 y 5, formando los denominados **fosfoinosítidos**. Se han identificado siete especies distintas de fosfoinosítidos dependiendo de la posición o posiciones del anillo de inositol que se fosforilen: fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P), fosfatidilinositol 4-fosfato (PI(4)P), fosfatidilinositol 5-fosfato (PI(5)P), fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PI(3,4)P₂), fosfatidilinositol 3,5-bifosfato (PI(3,5)P₂), fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂, simplificado como **PIP₂**), y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P₃, simplificado como **PIP₃**) (318); se puede apreciar la estructura de estas siete variantes en la Figura 8B. Las diferentes especies de fosfoinosítidos se pueden convertir unas en otras de forma rápida mediante fosforilación o desfosforilación a través de la acción de quinasas o fosfatasas específicas (318). La fosfolipasa C puede escindir el PIP₂, liberando DAG y formando **inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃)**, que actúa como segundo mensajero dentro de la célula (involucrado en el tráfico de Ca²⁺ intracelular en el retículo endoplásmico) (321); IP₃ también puede derivar en otros inositol fosfatos o reciclarse en MI (31,322). Como segundos mensajeros también destacan PIP₂, sustrato de PI3K, y cuya fosforilación a PIP₃ es un paso clave en la señalización de la insulina, tal y como se describió anteriormente en el apartado 4.1.4. “Vías canónicas de señalización del receptor de la insulina”.

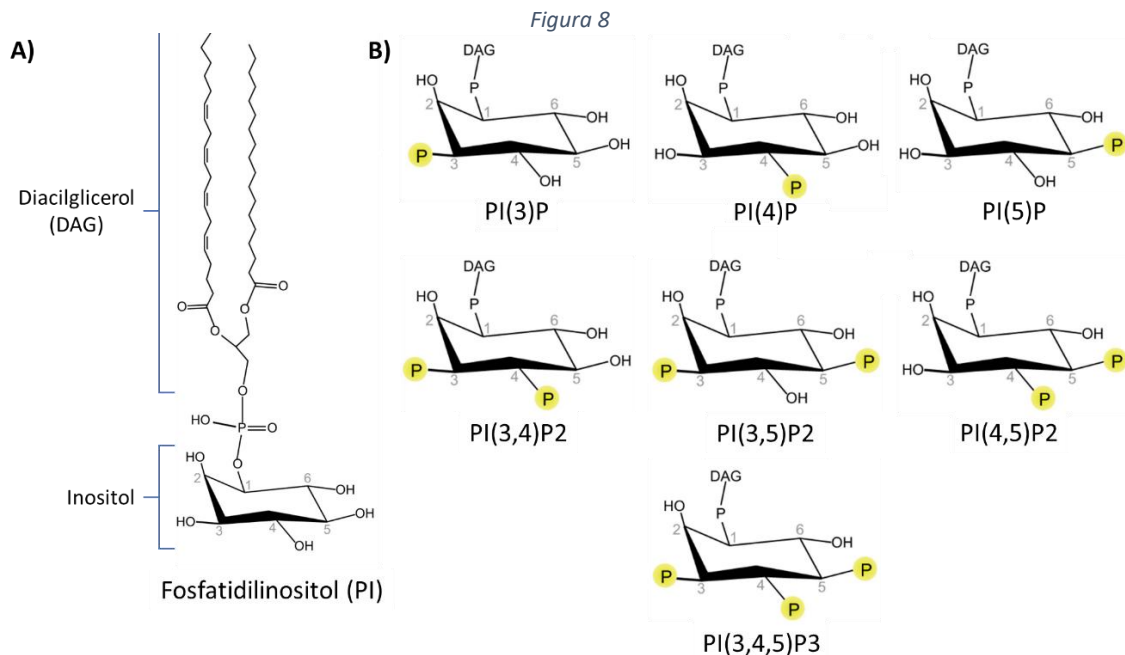


Figura 8. Representación esquemática de: **A)** Estructura del fosfatidilinositol (PI), que contiene un inositol (como cabeza hidrofílica) unido a un diacilglicerol (DAG) a través de un enlace fosfodiéster. **B)** Estructura de los diferentes fosfoinosítidos que pueden derivar del PI, los grupos fosfato se pueden unir a cualquiera de los grupos hidroxilo 3, 4 y 5 del anillo de inositol, formando las siguientes combinaciones: fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P), fosfatidilinositol 4-fosfato (PI(4)P), fosfatidilinositol 5-fosfato (PI(5)P), fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PI(3,4)P₂), fosfatidilinositol 3,5-bifosfato (PI(3,5)P₂), fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂), y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P₃). Adaptado de Li S et al., 2020 (318).

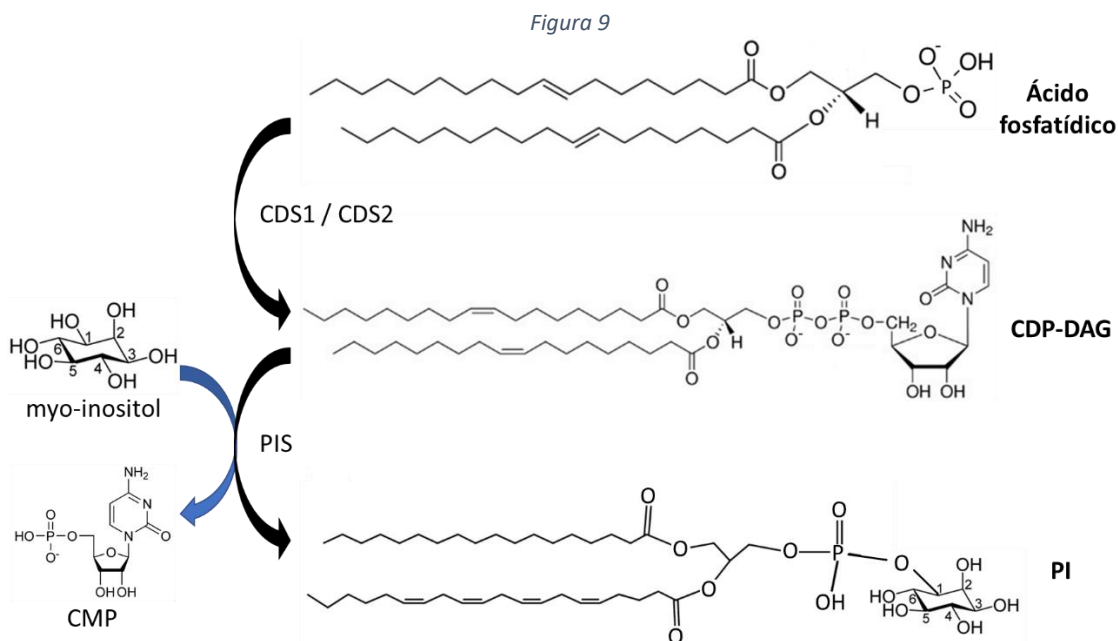


Figura 9. Proceso de biosíntesis de fosfatidilinositol (PI) que se produce en el retículo endoplasmático. Las citidina difosfato diacilglicerol sintasas (CDS1 / CDS2) convierten el ácido fosfatídico en citidina difosfato diacilglicerol (CDP-DAG), seguidamente, la fosfatidilinositol sintasa (PIS) une el grupo fosfatidil de CDP-DAG a una molécula de myo-inositol, formando así el PI y liberando citidina monofosfato (CMP) en el proceso.

4.5.3.2. Los glicosilfosfatidilinositoles (GPI)

Como se expone más arriba, en los tejidos de los mamíferos, los inositoles se pueden encontrar tanto en la cara interna de la membrana plasmática (PIs) como en la externa. En esta última se encuentran formando parte de los **glicosilfosfatidilinositoles (GPIs)** donde juegan un papel tanto estructural como funcional en la traducción de señales intracelulares y extracelulares.

Los GPIs están constituidos por la unión de residuos de azúcares (manosa, glucosamina) con PIs, son glucolípidos que sirven como **anclajes para proteínas extracelulares** (31). Estos complejos proteína-lípido están omnipresentes en los organismos eucariotas, y en los animales se encuentran en todo tipo de células y tejidos. Los componentes proteicos pueden liberarse del anclaje mediante la escisión enzimática del enlace proteína-lípido (323).

La estructura central de los anclajes GPI consta de un conector de fosfoetanolamina (encargado de unirse al extremo carboxilo de la proteína) que se acopla a un núcleo de glicano formado principalmente por residuos de manosa (pudiendo presentar otro conector de fosfoetanolamina) y glucosamina, que a su vez se une al fosfatidilinositol formado por el fosfoinositol más el residuo lipídico de la membrana celular (Figura 10). Si bien esta estructura está bastante conservada, los residuos de ácidos grasos pueden variar significativamente, así como las cadenas laterales de carbohidratos (323–325).

Figura 10

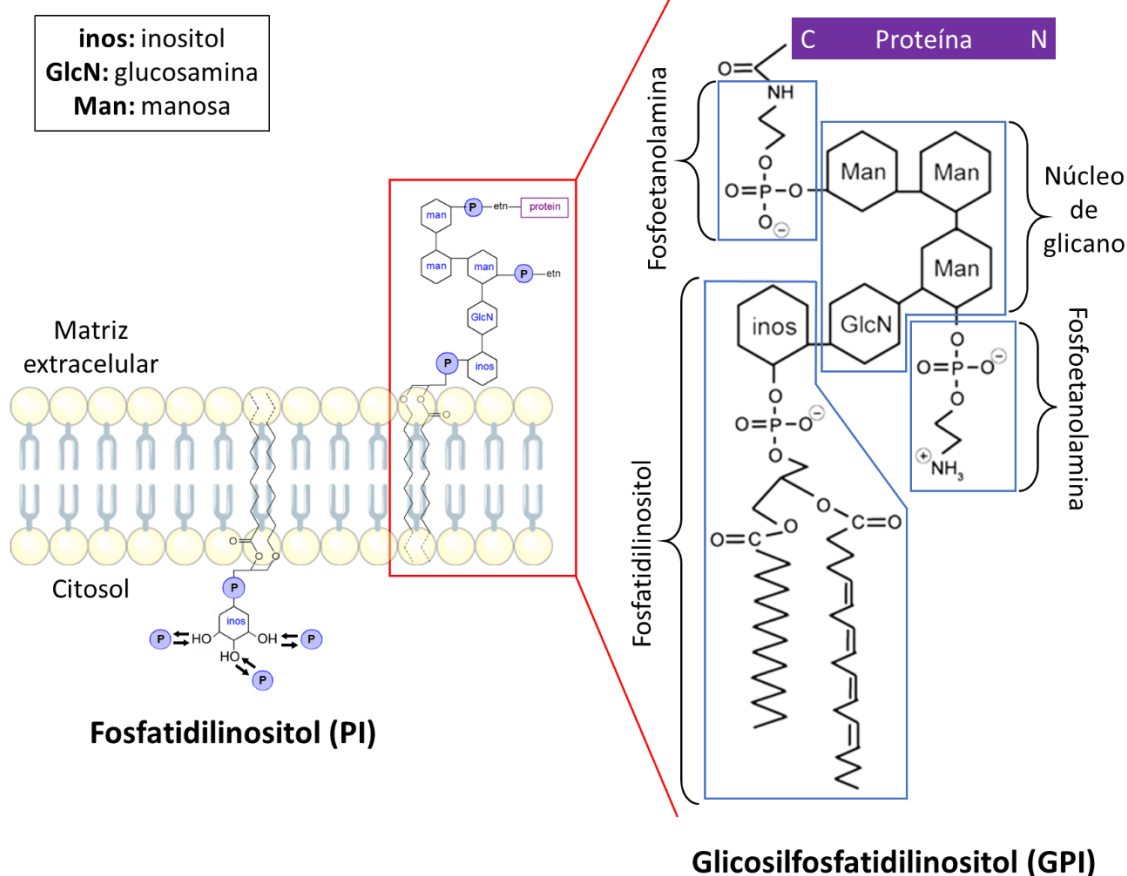


Figura 10. Representación esquemática de las características estructurales de **un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) unido a proteína**, presente en la membrana celular. El extremo carboxilo de la proteína está unido mediante fosfoetanolamina al núcleo de glicano formado por manosa (Man) y glucosamina (GlcN), unido a su vez al inositol (inos) que lleva el grupo fosfato y los residuos lipofílicos (fosfatidilinositol). También se representa la estructura simplificada del fosfatidilinositol (PI) en la cara interna de la membrana plasmática, que puede ser fosforilado en diferentes posiciones del anillo de inositol, formando las diversas variantes de fosfoinosítidos. Adaptado de Christie WW, 2023 (323), Desnoyer N et al., 2020 (324), y Heider S et al., 2016 (325). Partes de la figura se diseñaron utilizando imágenes de Servier Medical Art. Servier Medical Art de Servier está licenciado bajo Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

La principal función de los anclajes GPI es, como indica su nombre, actuar como punto de unión estable entre diferentes proteínas y la membrana celular, resistiendo la acción de la mayoría de proteasas y lipasas extracelulares (323). Los GPIs se unen covalentemente al extremo carboxilo de una proteína a través de una modificación postraduccional de la proteína en el retículo endoplasmático. Las **proteínas ancladas a GPI (GPI-APs)** presentan diversas e importantes funciones, como pueden ser la **actividad enzimática**, la **adhesión celular**, el **metabolismo de la pared celular** o las **respuestas inmunitarias** (323). Destaca su función para asegurar la fertilidad tanto del espermatozoide como del óvulo de ratón, así como para el crecimiento coordinado durante el desarrollo embrionario (323). Al igual que los PIs de la cara interna de la membrana plasmática, que transducen la señal intracelular desde receptores de membrana, estos compuestos GPI también pueden actuar como **moléculas de señalización** para mediar en la comunicación entre células.

Se ha propuesto que los anclajes GPI funcionan como **señales de clasificación** para la orientación selectiva de las GPI-APs en las vías secretoras y endocíticas. En levaduras, las

GPI-APs se clasifican y transportan desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi en vesículas que son distintas de las que transportan a otras proteínas secretadas (326).

En el cerebro, determinadas GPI-APs contienen moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF-CAM) que median en las interacciones entre neurona-neurona, y entre neurona-otras células del sistema nervioso, por lo que desempeñan un papel importante en la regulación del desarrollo neuronal, la formación de sinapsis y otras funciones cerebrales (323,327). A diferencia de las típicas moléculas IgSF-CAM, que son receptores de membrana con un dominio transmembrana y dominio intracelular, las GPI-IgSF-CAM no poseen tales dominios, sino que se unen a la membrana a través del anclaje GPI (323,327).

Una de las características de las GPI-APs es su organización espacio-temporal dentro de microdominios específicos de la membrana plasmática (también llamados “balsas lipídicas”), lo que juega un papel crucial para sus actividades biológicas. Por ejemplo, en células polarizadas como las células epiteliales, muchas GPI-APs se expresan exclusivamente en las superficies apicales, mientras que otras lo hacen preferentemente en las superficies basolaterales (328). Las GPI-APs también pueden actuar como transportadores transcitóticos, trasladando sus ligandos entre diferentes compartimentos de la célula, e incluso puede tener lugar la transferencia entre células (323,328).

4.5.3.3. Los inositol fosfoglicanos (IPGs) y derivados

La concepción que se tenía sobre la señalización celular clásica que desencadena la insulina (vía canónica) comenzó a cambiar con el descubrimiento de moduladores putativos de esta hormona, producidos por la actividad de **fosfolipasas** sobre GPIs (329,330). La porción lipídica que ancla a los GPIs a la membrana celular puede ser escindida por las enzimas lipasas glicosilfosfatidilinositol fosfolipasa D (**GPI-PLD**) y glicosilfosfatidilinositol fosfolipasa C (**GPI-PLC** o **PI-PLC**) para formar los productos: **inositol fosfoglicanos (IPGs)** además de ácido fosfatídico (en el caso de GPI-PLD) y de diacilglicerol (en el caso de GPI-PLC) (Figura 11A) (31,330).

La enzima GPI-PLD es muy abundante en suero de mamíferos, pero la forma circulante no posee actividad catalítica sobre los GPI presentes en la membrana de la superficie celular. Por el contrario, se ha propuesto que la GPI-PLD intracelular actúa sobre los GPI principalmente durante la vía secretora temprana, posiblemente en el retículo endoplásmico, lo que resulta en la producción de ácido fosfatídico en la membrana que puede, a su vez, convertirse por desfosforilación en diacilglicerol (331,332). Además, GPI-PLD se encuentra también en las balsas lipídicas de la membrana celular donde se concentran los GPIs y las GPI-APs, pudiendo actuar directamente sobre los GPI de membrana para formar IPGs (331,332).

Figura 11

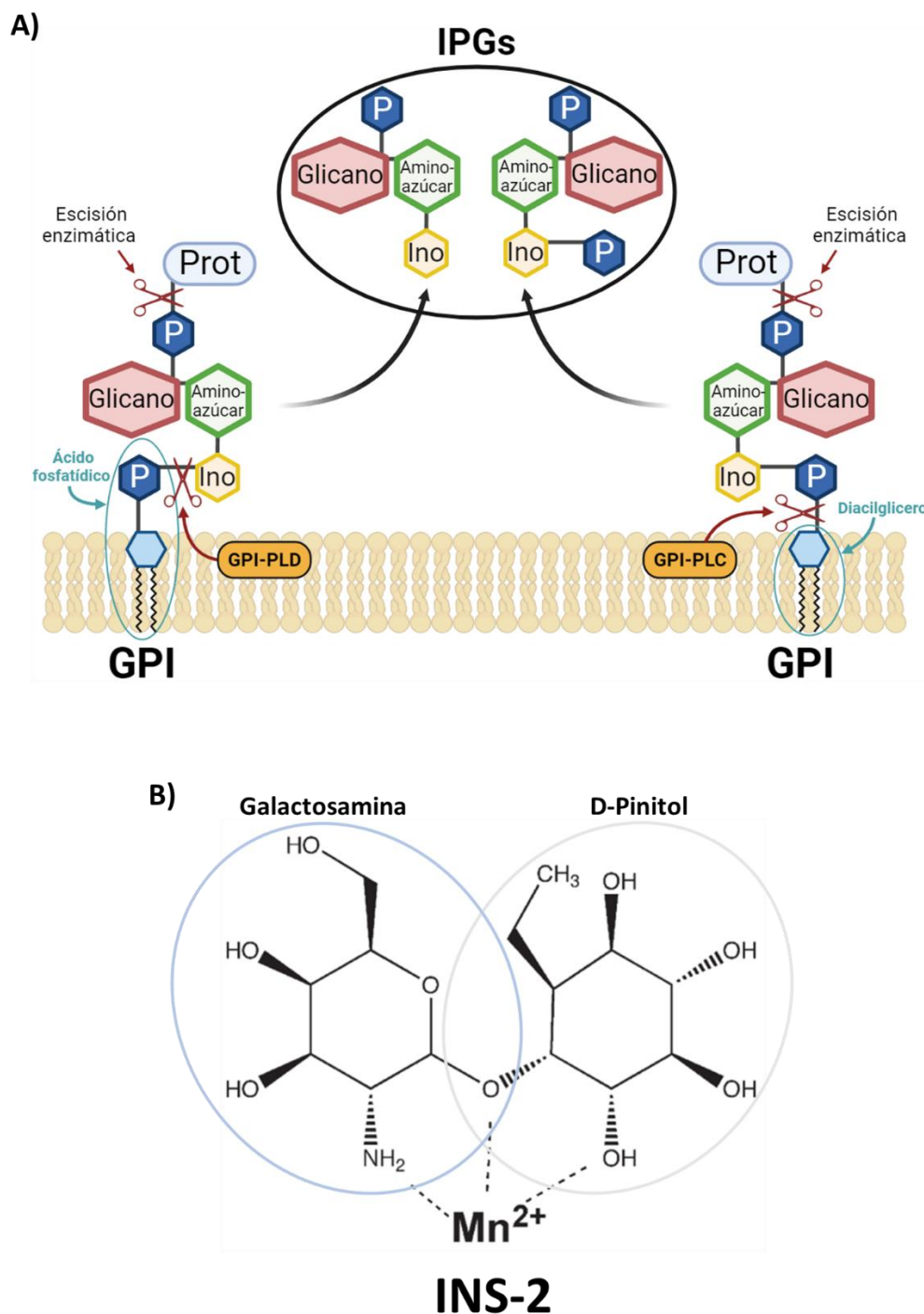


Figura 11. A) Representación simplificada del proceso de formación de inositol fosfoglicanos (IPGs) a partir de anclajes GPI: las enzimas glicosilfosfatidilinositol fosfolipasa D (GPI-PLD) y glicosilfosfatidilinositol fosfolipasa C (GPI-PLC) hidrolizan el enlace fosfato entre el inositol y los lípidos insertados en la membrana. GPI-PLD hidroliza el enlace entre el inositol y el grupo fosfato (produciendo ácido fosfatídico), mientras que GPI-PLC lo hace entre el grupo fosfato y las cadenas lipídicas, liberando así los inositoles unidos al fosfato (y produciendo diacilglicerol). La actividad de estas enzimas conduce a la formación de los IPGs. En caso de que el anclaje GPI esté unido a una proteína, se produce su separación a través de enzimas específicas. Prot: proteína, P: grupo fosfato, Ino: inositol, Glicano: formado por monosacáridos, Amino-azúcar: generalmente glucosamina o galactosamina. **B)** Estructura del segundo mensajero de la insulina INS-2 (D-Pinitol β-1,4 galactosamina quelado con manganeso). Parte de la figura (A) está creada usando las herramientas y representaciones disponibles en BioRender.com. Otra parte (B) es adaptada de Larner J et al., 2010 (36).

Tras la hidrólisis de los GPI inducida por lipasas, a partir de los IPGs obtenidos, se generan derivados diméricos inositol-amino-azúcar (o inositol-hexosamina); aunque la hexosaminidasa que hidroliza la unión entre el glicano y la hexosamina del IPG se desconoce. Tanto los IPGs como estos derivados putativos inositol-hexosamina actuarían como **segundos mensajeros**. En el citosol, ambos tipos de moléculas pueden regular enzimas actuando como quelantes catalizadores, coordinando el tráfico de metales como el Mn^{2+} y el Zn^{2+} intracelular, lo que les confiere la capacidad de controlar determinadas actividades quinasas y fosfatasa actuando como **cofactores enzimáticos** (333).

Cabe aclarar en este punto que en la mayoría de los trabajos se refieren a los derivados diméricos de los IPGs como inositol-glicanos (aunque no presentan glicano) y se habla de estos y de los IPGs indistintamente, por lo que, tal y como destacan Watkins OC et al., 2022 (333), frecuentemente se genera bastante confusión. Esto probablemente se debe a que la estructura y composición de la mayoría de los IPGs y de los inositol-hexosamina que derivan de estos no se conoce, por lo que estas moléculas, de momento, se clasifican en base a sus propiedades bioquímicas y a la capacidad de separarlas en dos fracciones.

La primera fracción, denominada **IPG-P**, eluye a pH 2.0 y la segunda fracción, denominada **IPG-A**, lo hace a pH 1.3. Clásicamente se considera que los IPG-P presentan como inositol principalmente DCI, mientras que los IPG-A contienen MI (333). Pero lo cierto es que no se conoce bien ni el tipo de inositol ni las cantidades relativas presentes en estas fracciones, lo que resulta complejo a la hora de analizar su actividad y de atribuirles propiedades biológicas de forma concreta a una o a otra. De hecho, hay evidencias que sugieren que ambas clases de IPGs contienen también un rango de isómeros de inositoles e inositol-fosfatos unidos a otro rango de glicanos y fosfoglicanos, y que muchos de sus componentes tienen efectos diferentes incluso si provienen de la misma fracción (333). Más aun, se ha comprobado que la composición de una u otra fracción de IPG respecto a, por ejemplo, la ratio DCI:MI, puede variar entre los fluidos biológicos y distintos tejidos. A pesar de todo ello, se conoce bien que ambas fracciones, como tales, muestran efectos miméticos de la insulina cuando se administran *in vivo*, ya que las dos son capaces de reducir la hiperglucemia en ratas sanas y en ratas diabéticas (por administración de estreptozotocina) (334).

Aun con las dificultades para la diferenciación entre IPGs, tradicionalmente a cada fracción se le han atribuido una serie de propiedades y características que se sintetizan a continuación:

- **Fracción IPG-A:** además del grupo fosfoglicano, contiene principalmente myo-inositol y D-glucosamina como inositol-hexosamina. Los IPGs-A contribuyen al control del nivel intracelular de AMPc y de los procesos regulados por este (31,335). Se ha demostrado que los IPGs-A activan la lipogénesis en adipocitos aislados, posiblemente a través de la inhibición de la producción de AMPc y la inhibición de AMPK (31,335–337). Kunjara S et al., 1999 (335) proponen que el aumento en los niveles de IPG-A rompe el equilibrio entre la lipogénesis y la lipólisis hacia la **síntesis y el almacenamiento de lípidos** en adipocitos, ya que se produce una disminución de AMPc que lleva a una menor actividad de la proteína quinasa A (PKA, que estimula la lipólisis) y a una activación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC, que promueve la lipogénesis). Aunque originalmente se propuso que la enzima responsable de la formación de IPG-A era la PLC, recientes estudios sugieren que la PLD también es capaz de generar estos IPG tipo A biológicamente activos a partir de GPI (338).
- **Fracción IPG-P:** además del grupo fosfoglicano, principalmente presenta D-chiro-inositol y galactosamina. Esta fracción IPG exhibe una especial acción sobre fosfatasa, activando en particular a la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (**PDHP**)

mitocondrial, a la proteína fosfatasa 2C α (**PP2C α**) citosólica, e indirectamente a la proteína fosfatasa 1 (**PP1**) citosólica (31,335,339,340).

En 2003, el grupo de Larner J et al. (339) consiguió aislar un derivado de la fracción IPG-P a partir de tejido hepático bovino. Este compuesto contenía una proporción molar 1:1 de 3-O-metil-D-chiro-inositol (D-Pinitol) y galactosamina unidos por un enlace β -1,4, al que se le denominó **INS-2** (Figura 11B). Es, por tanto, un inositol-hexosamina, que se produce tras la hidrólisis de un GPI por una fosfolipasa (que se especula que sea GPI-PLD) y que pertenece a la fracción IPG-P. Como se verá a continuación, se ha comprobado que INS-2 actúa como segundo mensajero de la insulina, ya que se une y activa alostéricamente a la fosfatasa dependiente de Mg²⁺ **PP2C α** en el citosol, la cual desfosforila y **activa la glucógeno sintasa (GS)** (31,341–343); además, INS-2 también puede estar presente en forma quelada con Mn²⁺ (Figura 11B), siendo entonces un modulador alostérico de la actividad de la **PDHP** mitocondrial, lo que promueve la oxidación de la glucosa (31,36,339).

4.5.3.4. Inositoles en la vía no canónica de señalización del receptor de la insulina

La vía no canónica de señalización del receptor de la insulina hace referencia a las respuestas celulares mediadas por el InsR que implican la activación de una cascada de eventos intracelulares alternativa a las vías clásicas conocidas, y ya desarrolladas en el apartado 4.1.4. de esta introducción.

Se han propuesto varias vías diferentes a las canónicas, pero una de ellas, la que conduce a la formación de IPGs, cobra interés en este trabajo por su relación con los inositoles que forman parte de compuestos de la membrana celular, y que intervienen o se incorporan a la vía clásica de señalización de la insulina. Aunque plantea algunas incertidumbres, el funcionamiento de la vía no canónica de señalización de la insulina **activada por IPGs** se puede explicar siguiendo el modelo propuesto por Larner J et al., 2010 (36), modelo que también es recogido en diversos estudios (31,41,344). Resumidamente, la activación del receptor de la insulina también podría estar acoplada a una proteína G heterotrimérica (**Gq**) que activaría a una fosfolipasa (PLD o PLC) que daría lugar a la producción de IPGs solubles y a sus derivados (como el compuesto **INS-2**). La liberación de IPGs se puede dar directamente en el citoplasma (ya que también existen GPIs en el retículo endoplasmático), o suceder en el medio extracelular (desde donde se incorporarían de regreso a la célula de origen o a células vecinas a través de los transportadores SMIT o HMIT). Asimismo, la liberación de IPGs no necesariamente tendría que ser iniciada por el mismo InsR. En cualquiera de los casos, una vez dentro de la célula, los IPGs y sus derivados inositol-hexosamina pueden actuar como segundos mensajeros putativos de la vía del InsR de las siguientes maneras:

- Algunos estudios han demostrado que la fosforilación en tirosinas de IRS-1 mediada por IPGs puede llevarse a cabo sin la intervención del InsR. En adipocitos de roedor se ha observado que este hecho es concomitante a la estimulación del tándem pp125FAK y la Src-tirosina quinasa soluble **pp59Lyn**. La activación de pp59Lyn puede inducir la fosforilación en tirosinas de **IRS-1** (345), que sirven como punto de anclaje y reclutamiento de la subunidad reguladora p85 de la PI3K. Esto resulta en la activación de la subunidad catalítica p110 de la PI3K, la exposición de su dominio quinasa y la colocalización de la quinasa con su sustrato PIP2 para generar PIP3. Esto último permitiría, a su vez, la colocalización de las enzimas PDK/Akt en la cara interna de la membrana celular, lo que lleva a continuar con la señalización corriente abajo. Por otro lado, la subunidad p85 también puede sufrir fosforilación en residuos de Tyr por quinasas de la familia Src y, entre ellas, por la quinasa pp59Lyn (346). La fosforilación en Tyr de p85 está relacionada con una mayor actividad de la PI3K, por lo que no se

descarta que la estimulación de la pp59Lyn mediada por los IPGs también sea responsable de la fosforilación e hiperactivación de p85 (346).

- Un estudio estructural predictivo propone que **INS-2 se une y activa alostéricamente a PP2C α** (341). Esta fosfatasa desfosforila a GS, dejándola activa, y promoviendo la **síntesis de glucógeno**. También se ha observado, en adipocitos 3T3-L1, que PP2C α desfosforila el residuo serina (Ser) 608 de la subunidad p85 de PI3K. Este hecho tiene importancia porque la Ser 608 fosforilada inhibe la actividad de PI3K; por tanto, PP2C α facilitaría la unión de la subunidad p85 con la subunidad catalítica p110, y de esta forma, la activación de PI3K (347,348).
- En la mitocondria, **INS-2 activa a PDHP** (339), que a su vez produce la desfosforilación de los residuos de serina de la PDH, activándola en el proceso. La PDH supone un punto de convergencia en la regulación del metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos, esta enzima en su estado activo convierte el piruvato proveniente de la glucólisis en acetil-coA, aumentando la entrada de esta molécula al ciclo de Krebs, y de esta forma potenciando el **metabolismo oxidativo de la glucosa** y reduciendo la oxidación de ácidos grasos. Si la PDH se encuentra inactiva, se potencia la entrada de acetil-coA al ciclo de Krebs a partir de la beta-oxidación de ácidos grasos, lo que conducirá a una mayor oxidación de grasas y a una desaceleración de la glucólisis (349).

En la Figura 12 se representa de forma esquemática y resumida la vía no canónica de señalización de la insulina y como converge con la vía canónica según lo expuesto anteriormente.

Los IPGs pueden contribuir de diferente forma a la señalización de la insulina, dependiendo de la especie, el tipo de tejido o célula, o la proporción tisular de inositol. Los IPG-P, que contienen D-Pinitol, podrían ser los principales mediadores en la señalización de la insulina, especialmente involucrados en la síntesis de glucógeno en tejido hepático y muscular (31). Este modelo proporciona un marco conceptual de como transcurre la vía no canónica, así como de las acciones de los inositoles como segundos mensajeros en esta ruta, regulando proteínas presentes en la vía canónica. Es decir, ambas vías actúan juntas para mediar en la acción de la insulina de manera complementaria y sinérgica.

Figura 12

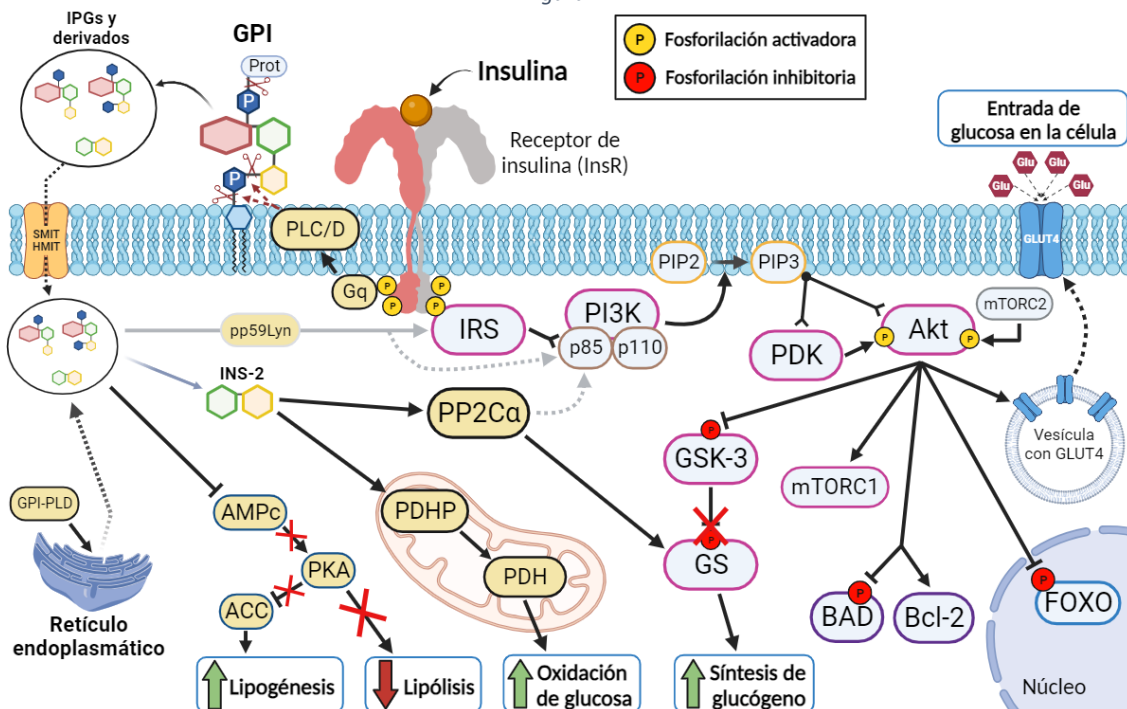


Figura 12. Representación simplificada de la **ruta no canónica** de señalización de la insulina y su convergencia con la canónica, en un modelo celular hipotético que expresa al mismo tiempo todos los componentes de la ruta. La vía no canónica comienza con la activación del receptor de la insulina que podría estar acoplada a una proteína G heterotrimérica (Gq), esta activaría fosfolipasas C y D, cuya acción sobre los anclajes GPI daría como resultado los segundos mensajeros IPG y sus derivados. Estos IPG, una vez en el citoplasma, regularían una serie de proteínas que pueden activar componentes de la vía canónica (desembocando en la síntesis de glucógeno), también pueden incentivar la lipogénesis, además de afectar a proteínas en la mitocondria que aumentarían el metabolismo oxidativo de la glucosa. Por otro lado, aparecen los principales componentes de la ruta PI3K/Akt pertenecientes a la vía canónica, activada por IRS, que da lugar a la fosforilación de Akt y como consecuencia se ponen en marcha la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina. Figura creada usando las herramientas y representaciones disponibles en BioRender.com.

4.5.3.5. Efectos insulino-miméticos directos de los inositoles y su relación con la diabetes

Como se acaba de mencionar, los segundos mensajeros que contienen inositol juegan un papel importante en la vía de señalización de la insulina, tanto canónica como no canónica. Este hecho ha llevado al desarrollo de estudios que muestran un **efecto directo** de la administración de inositoles sobre agentes clave de la ruta de señalización de la insulina (31), dejando patente su actuación como sensibilizadores o incluso miméticos de los efectos de esta hormona sobre las células, lo que potencia su importancia en la ruta de la señalización del receptor insulínico. Sin embargo, la caracterización farmacológica y bioquímica de las acciones de muchos de estos inositoles, en especial las formas metiladas, es poco profunda. La falta de información precisa farmacológica sobre estos compuestos es una de las principales razones que han motivado los estudios de la presente tesis doctoral.

Se ha demostrado que diferentes inositoles, entre ellos el DCI y su derivado metilado, el D-Pinitol, han sido capaces de estimular la captación de glucosa en mioblastos L6 de rata cultivados *in vitro*, al inducir la translocación del transportador de glucosa (GLUT4) hacia la membrana plasmática. Además, se ha visto este mismo efecto sobre GLUT4 en músculo esquelético *ex vivo* de rata (38). También se ha comprobado que tanto el MI como el DCI

causaron un aumento de la fosforilación de Akt, ERK1 y ERK2 en células endoteliales humanas (HUVEC) *in vitro*, produciéndose este efecto en ausencia de insulina (350). En este caso, cabe destacar que los inositoles no solo afectaron a la vía de PI3K/Akt/mTOR (en la que ya participan como segundos mensajeros), sino también a la de Ras/MEK/ERK mediante la activación de ERK. Siguiendo esta línea, en la que se observa que los inositoles pueden actuar de forma directa sobre componentes de la vía señalización de la insulina, existen estudios que muestran que el pretratamiento con Sequoyitol (5-O-metil-myo-inositol) produce una mayor fosforilación (y por lo tanto un aumento de la actividad) de IRS-1 y Akt en hepatocitos HepG2 y en adipocitos 3T3-L1 (351). En consonancia con estos resultados, el Sequoyitol aumentó la capacidad de la insulina para: 1) suprimir la producción de glucosa en cultivos primarios de hepatocitos de ratón, y 2) estimular la captación de glucosa en cultivos primarios de adipocitos también de ratón; disminuyendo así la hiperglucemia (351). Por otro lado, en cultivos primarios de neuronas hipocámpales de rata, tras la administración de DCI, D-Pinitol o INS-2, también se ha observado un aumento de la fosforilación/activación de componentes clave en la vía de señalización de la insulina (InsR, IRS-1 y Akt) (352).

Aunque es evidente que los inositoles libres *per se* pueden modular la vía de señalización de la insulina, se desconoce el mecanismo a través del cual actúan. Algunos de los efectos de los inositoles podrían explicarse a través de un aumento de la producción de IPGs, con el consecuente favorecimiento de la vía no canónica de señalización de la insulina (Figura 12); sin embargo, el hecho de que los inositoles ejerzan acciones directas sobre componentes aguas arriba de esta señalización, donde los IPGs no actúan, descarta la producción de IPGs como único medio de actuación de los inositoles libres (31). Existen varias hipótesis que plantean que los inositoles podrían poseer la capacidad de activación específica del InsR, o de regulación de sus vías inhibitorias (353–357), no obstante, estas teorías requieren de estudios más concretos y profundos, pues aún se desconoce si los inositoles realmente poseen estas capacidades.

Con lo aquí descrito, se pone de manifiesto la necesidad de estudios que profundicen en la acción de diferentes inositoles, sobre diferentes tejidos insulino-sensibles, y que realicen la administración del inositol en presencia y en ausencia de insulina; para así determinar con mayor precisión el punto de actuación de los inositoles y hasta dónde llega su efecto sensibilizador y mimético de esta hormona. Pero aun desconociendo el mecanismo exacto por el cual los inositoles regulan la señalización de la insulina, es evidente que pueden potenciar su efecto, e incluso imitarlo.

Tal y como ya se ha desarrollado en este texto, la diabetes implica un defecto en la secreción de insulina, en su acción sobre las células, o en ambos (358); y en muchas ocasiones viene precedida por un periodo prolongado de resistencia a la insulina. Cuando la vía de señalización InsR/IRS/PI3K/Akt sufre una importante disregulación, aparece un estado de resistencia a la insulina, en el que esta hormona se va volviendo progresivamente menos eficaz, dando lugar a una hiperglucemia y obligando al páncreas a aumentar su producción de insulina para restablecer la normoglucemia en el organismo. Pero con el tiempo se puede producir un “agotamiento pancreático”, debido a que las células β de este órgano terminan por sufrir graves daños por el aumento de las ROS generadas como consecuencia de la hiperglucemia sostenida, desembocando en una incapacidad para producir insulina y la aparición de T2DM. Conociendo los efectos de los inositoles sobre la señalización de la insulina, se hace evidente que podrían suponer un atractivo complemento para el tratamiento de la resistencia a esta hormona e incluso de la diabetes.

La resistencia a la insulina también se asocia con un aumento de la excreción urinaria de MI y una disminución de la de DCI, además de un menor contenido de DCI en el músculo (359). El aumento de la eliminación de MI probablemente sea debido a la inhibición mediada

por glucosa de la reabsorción de este inositol en el riñón, aunque no se puede descartar problemas en algún mecanismo de reabsorción dependiente de insulina (40,360). La escasez de MI, debido a un aumento de su eliminación o a una carencia en la dieta, tiene un impacto negativo directo en los niveles de DCI (361). Por lo tanto, es probable que tanto el agotamiento intracelular de MI como la disminución en la disponibilidad de DCI empeoren la resistencia a la insulina al afectar a su señalización (40). De hecho, pacientes con síndrome de ovario poliquístico (PCOS, de sus siglas en inglés *Polycystic Ovary Syndrome*, el cual se expondrá con más detalle en próximos apartados) que presentan resistencia a la insulina, así como pacientes con T2DM, muestran niveles plasmáticos y tisulares significativamente menores tanto de DCI como de IPGs (40,362,363). Aunque hay que aclarar que en el caso de sujetos que padecen PCOS con resistencia a la insulina, mientras que los tejidos que se ven afectados por esta resistencia sufren una disminución de DCI (debido a la reducción de la conversión de MI a DCI mediada por insulina), los órganos y tejidos que sí conservan su sensibilidad a la insulina (como el ovario) (364) muestran un estado contrario, es decir: un aumento en los niveles de DCI (debido a los elevados valores de insulina circulante) y una menor concentración de MI (365); y este desajuste en la relación MI/DCI dentro del ovario se asocia con un empeoramiento de la función ovárica (40,366,367).

También hay que destacar que existe una relación entre alteraciones en el metabolismo de la glucosa o el abuso de dietas ricas en glúcidos y una desregulación en los niveles de inositol, de hecho, los niveles altos de glucosa dificultan la disponibilidad de inositol al aumentar su degradación e inhibir tanto la biosíntesis como la absorción de MI (368).

Es evidente la asociación entre una desregulación de los niveles de diferentes inositoles (así como de derivados de estos) y estados de resistencia a la insulina, hiperglucemia y diabetes, por lo que, como se mostrará a continuación, la suplementación con inositoles en estos escenarios se ha comprobado como una estrategia beneficiosa.

Como exponen Chatree S et al., 2020 (369), existen multitud de estudios que demuestran que la administración de **MI y DCI contrarresta trastornos metabólicos** y disminuyen la resistencia a la insulina (369–374). Estos trabajos revelan que los inositol fosfatos, el MI en solitario, o el MI administrado junto a DCI, mejoraron el perfil lipídico (370), produjeron una disminución de la hemoglobina glucosilada (HbA1c, cuyo aumento se usa para el diagnóstico de diabetes) (373), redujeron los niveles de glucosa en sangre (370,373,374), y disminuyeron los valores del HOMA-IR (“modelo de evaluación de la homeostasis para la resistencia a la insulina”, usado como índice para la determinación de la resistencia a la insulina) en pacientes obesas con PCOS (370). Además, el MI disminuyó la absorción de glucosa por parte del yeyuno y la aumentó en el tejido muscular de ratas sanas, así como también frenó el vaciamiento gástrico y aceleró el tránsito digestivo en ratas diabéticas (374). Otro estudio mostró que la administración conjunta de MI y DCI disminuyó los niveles de insulina circulante después de una prueba de tolerancia oral a la glucosa en niños varones obesos que presentaban resistencia a la insulina (en comparación con los niveles de insulina de estos mismos sujetos sometidos a una GTT oral sin administración de inositoles) (371), lo que sugiere que estos compuestos pueden inducir sensibilidad a la insulina.

Gracias a las propiedades insulino-miméticas de los inositoles, estos son eficaces para frenar la resistencia a la insulina y reducir la glucemia posprandial, así como los trastornos asociados a la hiperglucemia (37). De hecho, la administración de inositoles ha resultado beneficiosa para la terapia y la reducción de la tasa de la diabetes gestacional, o para el tratamiento del síndrome metabólico y el PCOS (37,375–378).

También se ha planteado que compuestos derivados de inositol (principalmente inositoles con un número variable de fosforilaciones en diferentes carbonos del anillo) pueden jugar un papel importante en el correcto metabolismo de la glucosa, así como en la regulación

de la secreción de insulina en las células β -pancreáticas (379–381). Concretamente el ácido fítico (IP6, Figura 5, con un grupo fosfato en cada uno de los seis carbonos del anillo) ha demostrado producir diversos efectos beneficiosos para el metabolismo energético y en situaciones de trastornos metabólicos (369):

- La suplementación de IP6 en humanos redujo la glucosa en sangre y retrasó la digestión y absorción de carbohidratos después de su consumo (382).
- El tratamiento combinado de IP6 y MI pudo reducir el índice HOMA-IR en ratas diabéticas (383).
- En adipocitos de ratón 3T3-L1, la administración de IP6 junto con MI aumentó la captación de glucosa, los niveles de ARNm de IRS-1 y de GLUT4, así como la fosforilación en tirosina de IRS-1; por otro lado, redujo la lipólisis basal. Es decir, aumentó la sensibilidad a la insulina (384).
- IP6 tiene un papel importante en el tráfico a través de la membrana plasmática en células secretoras (como las células β -pancreáticas), ya que forma parte de mecanismos moleculares relacionados con la exocitosis y endocitosis, por lo que puede estimular la exocitosis de insulina (385–387).

Claramente el uso de inositoles y sus derivados presenta beneficios para el tratamiento/prevenición de desequilibrios metabólicos como la resistencia a la insulina. Sin embargo, la existencia de estudios que muestran una disparidad de resultados derivados de la administración de inositoles (38,39), pone de manifiesto que el efecto de la suplementación con estos compuestos puede variar dependiendo de un abanico de factores, algunos aún desconocidos (40). Por lo que, nuevamente, se necesitan más estudios que ahonden en los mecanismos celulares que se ven afectados por la administración de inositoles.

4.5.3.6. Otras funciones biológicas de los inositoles

Tal y como se ha expuesto anteriormente, los inositoles desempeñan un rol importante en varios procesos celulares formando parte de **segundos mensajeros**, entre los que destacan IP3, PIP2, PIP3 o los IPGs. Aunque también pueden actuar como cofactores de enzimas, como es el caso de los dímeros inositol-hexosamina (p. ej. INS-2). Es decir, son elementos importantes en las vías de señalización celular de muchos receptores de membrana. Pero, además, los inositoles (especialmente el MI) son necesarios para el correcto desempeño de un gran abanico de funciones celulares que se describen brevemente a continuación:

- **Crecimiento y supervivencia celular:** Se ha demostrado que los inositoles son esenciales para la supervivencia y el crecimiento de una serie de microorganismos, y también está comprobado que estos compuestos son factores de crecimiento fundamentales para una amplia variedad de líneas celulares humanas cultivadas *in vitro* bajo condiciones controladas (388). Los inositoles participan en diversos procesos biológicos para el mantenimiento de la célula, como la síntesis de fosfolípidos de la membrana plasmática, actúan como cofactores de enzimas (como se ha descrito antes), forman parte de segundos mensajeros, etc. (369,388).
- **Desarrollo y función de los nervios periféricos:** En estudios recientes usando ratones *knockout* del cotransportador SMIT1 para MI, se demuestra que el MI es esencial para el desarrollo y la función de los nervios periféricos, y en concreto para el desarrollo del nervio facial, vago, intercostal, el plexo braquial, y el nervio frénico que inerva el diafragma (389).

- **Formación de tejido óseo:** Se ha demostrado que la deficiencia de SMIT1 y de MI (ratones *knockout* para SMIT1) tiene un impacto perjudicial en el desarrollo esquelético prenatal y en la remodelación ósea posnatal. No obstante, la suplementación continua de MI a estos animales restauró parcialmente los fenotipos óseos anormales en la adultez. De esta forma se confirma la función esencial del MI en la osteogénesis, la formación ósea y la densidad mineral ósea. A esto hay que añadir los efectos beneficiosos del MI en el hueso normal (ratones *wild type*); por lo que, en su conjunto, estas propiedades abren la posibilidad de un potencial uso del MI o sus análogos como terapia para la osteoporosis (390).
- **Reproducción y fertilidad:** El hecho de que las concentraciones de inositol en los órganos reproductores masculinos y femeninos sean varias veces más altas que en el suero, sugiere que los inositoles juegan un papel en la reproducción humana. Esto se confirma por la implicación de los inositoles en el crecimiento embrionario temprano en varias especies animales, de hecho, los defectos del tubo neural (NTDs) que se pueden dar durante el desarrollo embrionario en ratones mutantes no diabéticos, pueden ser prevenidos mediante la suplementación con inositol (aunque hay formas de NTDs resistentes a este tratamiento) (306).

También existen estudios que demuestran el papel de los inositoles como segundos mensajeros de la señalización de Ca^{2+} en el desarrollo de los ovocitos, se ha comprobado que una suplementación con MI puede ayudar al desarrollo de óvulos listos para la fertilización, y por el contrario, el agotamiento de MI desensibilizará la señalización de PI y reducirá la liberación de IP3, lo que provocará una interrupción de la dinámica transitoria del Ca^{2+} intracelular y la paralización de la maduración de los ovocitos (391). Debido al papel fundamental que desempeñan las oscilaciones de Ca^{2+} durante la maduración del ovocito, la fecundación y la embriogénesis, es esencial contar con MI biodisponible en el organismo durante estos procesos (391).

Otro campo importante en el que los inositoles juegan un papel esencial es el tratamiento del **síndrome de ovario poliquístico (PCOS)**. Este síndrome es un trastorno reproductivo y metabólico multisistémico que afecta al 5-25% de la población total femenina en edad reproductiva. Es responsable de problemas de ovulación y menstruación, alteraciones metabólicas y hormonales, hiperandrogenismo, aparición de quistes en los ovarios, y además es la principal causa de infertilidad en mujeres (375,391). La disfunción metabólica asociada al PCOS incluye resistencia a la glucosa y a la insulina, dislipidemia, T2DM, mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y aumento de la prevalencia de la obesidad (375). Se desconoce la patogenia del PCOS, puede deberse a la sobreproducción de andrógenos en los primeros años de vida (375), aunque posiblemente la causa que subyace sea la resistencia a la insulina, que afecta aproximadamente al 70% de las pacientes con esta dolencia, y, de hecho, una alta concentración de insulina es la causa principal de hiperandrogenismo (391,392). La relación entre el PCOS y la insulina llevó al uso de sustancias sensibilizantes a esta hormona (como troglitazona, inositol y principalmente metformina) como principal vía de tratamiento. En relación a los inositoles, se ha demostrado que la administración de MI normaliza la menstruación, restaura la ovulación (tanto por su actividad sensibilizante a la insulina como por su papel en la maduración de los ovocitos), y mejora el patrón metabólico y hormonal en mujeres que padecen PCOS (391,393–397). Por el contrario, una alteración en la disponibilidad tisular de inositol o en su metabolismo, es una de las causas de la resistencia a la insulina que se da en el PCOS (362). También se ha demostrado los beneficios de la administración de DCI en mujeres que padecen PCOS, ya que reduce la presión arterial, los triglicéridos plasmáticos y la concentración de glucosa en sangre, además de mejorar la función ovárica (375,398). Pero el papel que juega el DCI a nivel ovárico

sigue siendo controvertido, ya que se puede producir un empeoramiento de la calidad ovocitaria y de la respuesta ovárica cuando se utilizan dosis elevadas durante periodos prolongados. Esto es debido a un desajuste de la proporción fisiológica de MI y DCI en el líquido folicular, ya que el detrimento de MI a favor de DCI compromete la señal de la hormona foliculoestimulante (FSH), clave para la maduración de los folículos, lo que resulta en una calidad reducida de los ovocitos, anovulación y subfertilidad (366). Sin embargo, estos estudios se han realizado en el contexto de la obtención de ovocitos para reproducción asistida, en los que las mujeres donantes se han sometido a una hiperestimulación hormonal, lo que sugiere que el DCI podría tener efectos biológicos diversos en función del contexto hormonal. Por otro lado, la deficiencia de DCI puede conducir a la resistencia a la insulina y, dado que las pacientes con PCOS muestran niveles bajos de DCI en plasma, se destaca aún más la correlación detectada entre las variaciones en los niveles plasmáticos de DCI y la resistencia a la insulina (37,375).

Los inositales también presentan una función en la quimiotaxis y termotaxis del esperma humano, ya que participan en la regulación de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (importante para activar y mantener la movilidad en los espermatozoides) (399). Asimismo, se ha demostrado que el MI puede aumentar el número total de espermatozoides y mejorar su función mitocondrial, mejorando así su movilidad (400). Por lo que se abre la puerta al uso de MI para aumentar la fertilidad de pacientes con parámetros espermáticos alterados; además de su posible uso en técnicas de reproducción asistida *in vitro*, tanto para aumentar la cantidad de espermatozoides que se usarán para la inseminación intrauterina como para mejorar la calidad de estos (400).

- **Regulación del sistema inmune:** Tal y como se menciona con anterioridad en el epígrafe 4.1.4. “Vías canónicas de señalización del receptor de la insulina”, estudios recientes proponen que la insulina desempeña un papel fundamental en la regulación de la función inmune. En base a la implicación de los inositales en la señalización del InsR, es razonable pensar que estos puedan ejercer por sí mismos efectos en el sistema inmunológico. De hecho, se ha observado que ciertos inositales, como el MI, pueden ayudar a regular la respuesta inflamatoria y reducir la producción de citoquinas proinflamatorias (401). Además, se ha investigado el papel de los inositales en condiciones autoinmunes, como es el caso de la tiroiditis autoinmune (402) y, si bien aún se requiere mucha más investigación, algunos estudios preliminares sugieren que los inositales podrían ejercer propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes que serían beneficiosas en estas enfermedades.

4.5.4. Posibles usos farmacológicos de los inositales

Por las propiedades ya descritas de los inositales, se ha incrementado su investigación y empleo con propósitos médicos, y el tratamiento con inositales en escenarios de disfunción metabólica relacionada con resistencia a la insulina ha demostrado sus beneficios. En este trabajo se ha descrito la eficacia terapéutica de los inositales en el tratamiento del PCOS y su labor en la reproducción humana, así como su papel preventivo de la diabetes gestacional y los defectos del tubo neural (403). Concretamente el MI, la isoforma más común, ha demostrado tener efectos ventajosos sobre el metabolismo, la reproducción, el crecimiento y la supervivencia celulares, y el desarrollo del sistema nervioso en humanos (37,369). Además, también se ha demostrado que los inositales pueden mejorar el perfil lipídico, produciendo una disminución de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y los triglicéridos en plasma, conjuntamente con un aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL); al igual que una reducción en el contenido de lípidos del miocardio, pudiendo ayudar a mejorar enfermedades cardíacas (369,370,404). Así mismo, ensayos clínicos que usan inositol en dosis farmacológicas

están arrojando resultados sorprendentes en el manejo de otras dolencias, como el síndrome de estrés respiratorio, la enfermedad de Alzheimer, o el cáncer, para los cuales los tratamientos convencionales no terminan de ser solventes (405). Uno de los usos más atractivos de los inositoles es en situaciones de enfermedad de Alzheimer, dado que tanto el déficit como la resistencia a la insulina en cerebro es uno de los factores disparadores de esta dolencia (31,406). En este contexto, se postula que los inositoles puedan participar en una protección neuronal a través de la ruta Akt/Bcl-2 (que facilita la supervivencia), o a través de Akt/inhibición de GSK-3 (que conduce a la disminución de la fosforilación de tau) (66,407). Con respecto al cáncer, sería interesante abordar con más profundidad la posible utilidad clínica de los inositoles, ya que, varios estudios han demostrado que la resistencia a la insulina y sus consecuencias metabólicas (hiperglucemia e hiperinsulinemia) están estrechamente asociadas con un mayor riesgo de padecer varios tipos de cáncer (40). Teniendo en cuenta que los inositoles presentan beneficios para el tratamiento/prevenición de la resistencia a la insulina, se puede plantear que la administración de inositoles también puede ser positiva para la prevención y el tratamiento del cáncer. De hecho, estudios preliminares *in vivo* demostraron un efecto beneficioso de los inositoles para antagonizar con el desarrollo del cáncer, por lo que su utilidad clínica merece ser abordada adecuadamente mediante ensayos aleatorios específicos (40).

Por otro parte, además de la modulación de la señalización de la insulina, los inositoles podrían ayudar a disminuir la carga del estrés oxidativo asociado a trastornos metabólicos como la hiperglucemia (31). En estas situaciones de estrés oxidativo, los inositoles (concretamente el D-Pinitol, que se verá más adelante) han demostrado disminuir la producción de radicales libres, así como de producir un aumento de la actividad de enzimas antioxidantes (408–413), aunque aún es necesario determinar los mecanismos exactos por los que se producen estos efectos.

Dado que los inositoles se pueden captar a través de la dieta a partir de productos de origen natural, se les podría considerar sustancias nutraceuticas (31), y aunque el significado de este término es objeto de controversia, es indudable que los inositoles se obtienen de fuentes naturales y presentan beneficios específicos para la salud, ya sea por su efecto contra ciertas dolencias o por su papel preventivo de otras. Sin embargo, a pesar de los amplios estudios realizados para caracterizar estos efectos, no se ha logrado una comprensión completa de todos los mecanismos que desencadenan los inositoles (404). Por lo que se vuelve a hacer hincapié en la necesidad de estudios que profundicen en como los diferentes tipos de inositoles, en diferentes escenarios, modulan procesos celulares. En este contexto surge este trabajo, donde se intenta describir con más detalle la farmacocinética y efectos que desencadena un inositol en concreto: el **D-Pinitol**, ya sea administrado en solitario, o formando parte de un jarabe compuesto principalmente de glucosa y fructosa.

4.6. D-Pinitol

El DCI y el MI son los estereoisómeros de inositol más estudiados en procesos biológicos, siendo estos, junto al SI, los principales inositoles presentes en tejidos de mamíferos (31). El DCI se puede sintetizar endógenamente en pequeñas cantidades, pero en humanos, la mayor parte se puede obtener a partir de la ingesta de su derivado metilado, el D-Pinitol (3-O-metil-D-chiro-inositol), ya que este puede ser desmetilado en los medios ácidos del estómago. A continuación, se explorará las propiedades y efectos que presenta el D-Pinitol, así como las perspectivas de futuro que plantea su uso, ya que la actividad farmacológica exhibida por este compuesto lo postula como una alternativa para combatir diferentes dolencias.

4.6.1. Fuentes de obtención y propiedades fisicoquímicas del D-Pinitol

El D-Pinitol (enantiómero D del Pinitol, con fórmula molecular $C_7H_{14}O_6$, Figura 4B) está presente de forma natural en multitud de plantas, y dependiendo de la planta puede aparecer en mayor o menor cantidad en diferentes partes de esta (flores, tallo, hojas, etc.) (42). Su nombre deriva etimológicamente de la palabra "pino", ya que fue aislado y caracterizado estructuralmente por primera vez a partir del pino blanco occidental, *Pinus monticola* (41,414). Por esto, no es de extrañar que sea abundante en plantas pertenecientes al género *Pinus*; aunque también lo es en las hojas de *Bougainvillea spectabilis*, o especialmente en la familia de las leguminosas: como en la planta de soja (*Glycine max*), o en las vainas del algarrobo (*Ceratonia siliqua*) (41–44). Concretamente a partir del algarrobo, una especie nativa y muy extendida en la cuenca del mediterráneo (415), se puede llevar a cabo el aislamiento y producción industrial de D-Pinitol, ya que llega a proporcionar de 10 a 80 g/Kg de este derivado de inositol (304,416), siendo una de sus fuentes naturales más rentables. La principal función descrita del D-Pinitol en plantas es la de actuar como osmolito, mejorando la tolerancia al estrés abiótico causado por condiciones ambientales extremas, como la sequía, una alta salinidad o altas temperaturas (305,417).

Si bien el D-Pinitol se puede encontrar en abundancia en plantas, también se puede lograr su síntesis artificial a través de una combinación de diferentes métodos químicos y bioquímicos que presentan rendimientos variables (417–422).

El D-Pinitol aislado se presenta como un sólido de color blanquecino con un peso molecular de 194,18 g/mol, y un punto de fusión de 186-187°C; siendo muy soluble en agua y ligeramente soluble en etanol (417,423).

Como se verá continuación, este inositol se postula como posible sustancia terapéutica natural por sus efectos positivos en diferentes trastornos, ya que posee propiedades insulino-miméticas (con beneficios en desórdenes asociados a la resistencia a la insulina en cerebro), antioxidantes o antiinflamatorias entre otras (41,66,417).

4.6.2. Actividad farmacológica del D-Pinitol

Las plantas ricas en D-Pinitol se han usado en la medicina tradicional como tratamiento empírico de diferentes alteraciones, como diabetes, inflamaciones, cáncer o infecciones (41). De hecho, se cree que el D-Pinitol es el principio activo del remedio tradicional “*talisapatra*” (también llamado “*morinda*” en idioma hindi), derivado de la especie de abeto *Abies pindrow*, y que ha sido usado durante siglos en el sistema de medicina tradicional indio (“*Ayurveda*”) para el tratamiento de diversas dolencias respiratorias e inflamatorias (417,424). También ha sido común el uso de plantas medicinales tradicionales para combatir la diabetes, como las hojas de *Bougainvillea spectabilis* (425–427), de las que ya se sabe que son una fuente importante de D-Pinitol. Sin embargo, este inositol natural tiene un potencial farmacológico mucho mayor, ya que, como se procede a detallar, presenta efectos beneficiosos en un amplio espectro de procesos biológicos.

4.6.2.1. Como antioxidante

En las últimas décadas, el estudio del estrés oxidativo ha tenido cada vez más relevancia en investigaciones pertenecientes a múltiples áreas, ya que existe una estrecha relación entre la aparición de estrés oxidativo y disfuncionalidades en diferentes procesos biológicos, como en enfermedades autoinmunes, infecciones, fenómenos de carcinogénesis, trastornos metabólicos o envejecimiento (417,428,429).

Atendiendo a los efectos no deseados que produce un aumento descontrolado de agentes oxidantes, muchos estudios se centran en buscar sustancias farmacológicas con poder antioxidante que puedan equilibrar las reacciones redox. Como ya se sabe, los inositoles presentan beneficios directos en situaciones de resistencia a la insulina que conducen a una desregulación del metabolismo de la glucosa, y también es sabido que la hiperglucemia crónica contribuye al incremento de la generación de especies reactivas de oxígeno (430); por lo que algunos estudios han puesto el foco en los inositoles bajo este contexto, y concretamente el D-Pinitol ha demostrado que podría ser un antioxidante prometedor.

Sivakumar S et al., 2009 y 2010 (431–434) indujeron diabetes en un modelo de rata a través de la administración de estreptozocina (STZ) (435), con este método se consigue la destrucción de las células beta pancreáticas por dos mecanismos diferentes: primero, la STZ se intercala en el ADN de las células, y segundo, se produce la formación de oxidantes (especialmente óxido nítrico, que puede reaccionar con O₂- y originar peroxinitrito) capaces de producir un gran daño celular. Mediante este segundo mecanismo, la toxicidad provocada por la STZ se expande a otros órganos como el hígado o el riñón (41). En este modelo, los autores demostraron que el D-Pinitol fue capaz de revertir los efectos de la STZ no solo en el páncreas, sino también en otros órganos afectados, disminuyendo el estrés oxidativo. El mecanismo de acción del D-Pinitol posiblemente sea a través de sus propiedades insulino-miméticas. Por un lado, el D-Pinitol disminuye los niveles de glucosa en sangre, favoreciendo así una menor generación de ROS (asociada a la hiperglucemia), y ayudando a una **mejor actividad de los antioxidantes** que en el estado diabético se consumen rápidamente intentando disminuir los elevados niveles de radicales libres producidos. De hecho, en estos animales diabéticos tratados con D-Pinitol, se ha comprobado una restauración de los niveles plasmáticos y tisulares de compuestos antioxidantes como las vitaminas C y E, o el glutatión, así como de la actividad de otras enzimas antioxidantes. Sumado a esto, las observaciones histológicas de los tejidos afectados corroboraron el efecto protector/reparador del D-Pinitol.

No se descarta que el D-Pinitol pueda ejercer efectos antioxidantes de eliminación de radicales libres por alguna otra vía diferente a las mencionadas. Otros trabajos también han demostrado la acción del D-Pinitol contra la peroxidación lipídica producida en hígado por una dieta rica en grasas durante 10 semanas (436). En este caso, se ha comprobado que el D-Pinitol induce la expresión de la enzima paraoxonasa (PON), la cual presenta actividad antioxidante. Concretamente la isoforma PON1 tiene un importante papel en la prevención de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Este es otro posible mecanismo de actuación antioxidante del D-Pinitol, aunque se deben realizar más estudios para determinar qué isoforma de PON está siendo inducida.

Además de las ya citadas, existen más investigaciones que muestran el efecto antioxidante del D-Pinitol (410,437,438), pero hay que mencionar que los efectos de este inositol sobre el estrés oxidativo no han sido los mismos en todos los casos, dependiendo de diversos factores como la concentración administrada o la patología previa que presente el sujeto. En cualquier caso, es evidente la capacidad protectora del D-Pinitol frente a la formación de radicales libres, mejorando situaciones de estrés oxidativo generadas por la administración de tóxicos o por disfuncionalidades previas. Se debería abordar si el D-Pinitol también tiene capacidad preventiva contra la formación de especies reactivas de oxígeno en poblaciones sanas.

4.6.2.2. Como antiinflamatorio

La inflamación es un proceso protector que tiene el organismo para enfrentar una variedad de daños en las células y los tejidos. Una respuesta inflamatoria “normal” se produce para combatir una lesión o infección, y es debida a la convergencia de células inmunes de

diferentes tipos en la zona alterada. Pero puede ocurrir que los procesos inflamatorios se descontrolen, lo cual es un factor importante en el desarrollo de trastornos degenerativos como algunos tipos de cáncer, artritis reumatoide o asma (439). Situaciones de estrés oxidativo generadas por un aumento excesivo de radicales libres contribuyen a episodios de inflamación, ya que se estimula la actividad de mediadores como NF- κ B, que a su vez aumentan la producción de moléculas proinflamatorias como interleucinas (IL-1 β o IL-6) o TNF- α , además de otros mediadores de inflamación como ciclooxigenasa-2 (COX-2) u óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (41,440,441). Estos eventos de estrés oxidativo e inflamación se han identificado en la patogenia y el desarrollo de un gran número de dolencias, como enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas, cardiovasculares o cáncer (41,442).

Como ya se comentó, el D-Pinitol presenta actividad antioxidante; y en la búsqueda de agentes antiinflamatorios con potencial terapéutico, diferentes trabajos también han mostrado los beneficios de este inositol en procesos inflamatorios. Estudios en macrófagos THP-1 tratados con lipoproteínas de baja densidad oxidadas (para favorecer procesos relacionados con la inflamación) (437), mostraron que el tratamiento con D-Pinitol inhibió la formación de células espumosas cargadas de lípidos, disminuyendo significativamente la liberación de TNF- α y de la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), así como las secreciones de IL-1 β e IL-8. En otras palabras, el D-Pinitol redujo la producción de moléculas proinflamatorias.

De igual forma, en ratas con inflamación aguda (por la inyección subcutánea de carragenina para favorecer la formación de un edema en la pata) y subaguda (formación de granuloma por la implantación subcutánea de bolitas de algodón), el D-Pinitol, tanto administrado en solitario, como en **combinación con glucosamina** mostró un efecto antiinflamatorio al reducir el volumen del edema y el peso del granuloma (443,444). Este efecto fue sinérgico contra la inflamación subaguda cuando ambos tratamientos se administraron en combinación (443,444). El D-Pinitol también ha mostrado efectos protectores contra la inflamación relacionada con la artritis reumatoide, a través de la reducción de citoquinas proinflamatorias y mediadores inflamatorios por medio de la inhibición de PTPN22 (445). Asimismo, análogos semisintéticos del D-Pinitol han mostrado capacidad para inhibir la secreción de la citoquina TNF- α en neutrófilos humanos estimulados por inyección de lipopolisacáridos (un importante factor desencadenante de la respuesta inflamatoria) (446).

4.6.2.3. Como inmunosupresor

Se acaba de describir como la administración de D-Pinitol presenta una muy buena actividad antiinflamatoria, con la consecuente inmunomodulación que esto conlleva; pero los efectos del D-Pinitol sobre el sistema inmune no solo se limitan a impedir/reducir la inflamación, sino que ejerce otras actividades que ayudan a mantener un equilibrio inmunológico.

Por ejemplo, Chauhan PS et al., 2011 (447), sugieren que el D-Pinitol puede actuar como un inmunosupresor potente y seguro, ya que produjo una inhibición de linfocitos CD3, CD4, CD8 y CD19, así como una disminución de la expresión de citoquinas Th1/Th2 en esplenocitos; estos resultados fueron obtenidos a partir de un modelo animal de ratón después de una inducción de la actividad del sistema inmune. Asimismo, en un modelo experimental de asma inducido por ovoalbúmina, el D-Pinitol ha sido capaz de disminuir las reacciones asmáticas típicas, además del número de eosinófilos, la infiltración de células inflamatorias en el tejido pulmonar y el desarrollo de hiperreactividad en las vías respiratorias a través de la **supresión de la respuesta inmune de las citoquinas Th2** (41,448). Por otro lado, también existen hallazgos del papel inmunofarmacológico del D-Pinitol sobre **células**

dendríticas murinas derivadas de médula ósea (tratadas con lipopolisacáridos para estimular la respuesta inmunitaria) (449); en estas células se ha demostrado que el D-Pinitol inhibe significativamente la expresión de CD80, CD86 y los complejos mayores de histocompatibilidad de clase I y II (MHC-I/II). En este estudio también se comprobó que el D-Pinitol inhibe la maduración de las células dendríticas, además de modular la producción de citoquinas de estas, lo que resulta en una inhibición significativa de la capacidad de iniciar una respuesta Th1 (449). Los mecanismos celulares involucrados en estos efectos se relacionaron con la inhibición de la estimulación de MAPK que desencadenan los lipopolisacáridos, así como **la inhibición de la translocación nuclear de NF-kB** (449).

Atendiendo al mecanismo por el que el D-Pinitol ejerce su actividad inmunomoduladora, parece claro que este compuesto actúa como regulador del equilibrio Th1/Th2 (417), el cual es necesario para una correcta respuesta del sistema inmune ante diferentes situaciones. Sin embargo, la literatura parece mostrar resultados contradictorios en los efectos del D-Pinitol sobre la producción de citoquinas Th1/Th2, posiblemente esto sea debido a los diferentes escenarios en los que este inositol se administra, pudiendo desencadenar unos efectos u otros dependiendo del contexto inmunológico que se presente. En cualquier caso, la capacidad inmunosupresora del D-Pinitol ha demostrado ser una estrategia prometedora para la prevención y el manejo de enfermedades autoinmunes o relacionadas, con efectos secundarios potencialmente menores que los fármacos sintéticos actualmente disponibles, como la ciclofosfamida (417). Incluso se han desarrollado patentes de la actividad inmunosupresora de ciertas formulaciones que contienen D-Pinitol (450,451).

4.6.2.4. Como anticancerígeno

Se ha conseguido comprobar que el D-Pinitol presenta efectos beneficiosos en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. La administración de este compuesto ha supuesto una reducción de la migración y la invasión de células de cáncer de próstata *in vitro*, posiblemente a través de una **reducción de la expresión y actividad** de diferentes proteínas relacionadas con la propagación y adhesión de células tumorales (integrina $\alpha\beta 3$, forma fosforilada de la quinasa de adhesión focal (FAK) o NF-kB); produciendo estos efectos antimetástasis de una forma no invasiva (452). Por otro lado, el D-Pinitol también ha demostrado eficacia frente al cáncer de mama inducido en ratas (453,454), produciendo una **inhibición del crecimiento tumoral** a través de la modulación de diferentes hormonas, citoquinas inflamatorias o marcadores tumorales entre otros procesos bioquímicos (inhibición de la vía de NF-kB, disminución de los niveles séricos de interleucinas y TNF- α , etc.) (455,456). A esto hay que sumar el efecto antioxidante del D-Pinitol, produciendo una defensa contra el estrés oxidativo que sufren los tejidos hepático y renal durante el cáncer de mama (409,457), además de contrarrestar en gran medida el aumento de los niveles plasmáticos de algunos tipos de lípidos (colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos libres y triglicéridos) observado en el grupo de ratas con cáncer (456).

A partir de los diferentes estudios que muestran un efecto terapéutico del D-Pinitol contra el cáncer, se ha sugerido que su principal mecanismo de acción se basa en un **bloqueo activo de la vía de NF-kB** (424); este factor de transcripción regula la expresión de genes implicados en muchos procesos clave del desarrollo y la progresión del cáncer, como la proliferación, la migración y la apoptosis. De hecho, NF-kB se activa por influencia de un número importante de carcinógenos y agentes inflamatorios, y se ha detectado una desregulación de su actividad en muchas neoplasias malignas humanas (417,458). Hoy día, NF-kB se contempla como una diana terapéutica interesante para el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer, más potentes y menos nocivos.

En este punto es importante tener presente la relación entre Akt y NF- κ B, la cual es dependiente del contexto y de las señales específicas presentes en la célula. En muchos casos, la vía Akt activa NF- κ B, pero también tiene la capacidad de producir su inhibición en ciertos contextos, especialmente a través de su interacción con GSK-3 β , FOXO y al favorecer un ambiente metabólico antiinflamatorio. Como se detallará más adelante, el D-Pinitol presenta propiedades insulino-miméticas, que llevan a una activación de la ruta de Akt; por lo que las propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras del D-Pinitol, así como sus beneficios sobre el cáncer, podrían estar relacionados con su capacidad para inhibir NF- κ B a través de la vía Akt.

Una buena muestra de la acción del D-Pinitol sobre NF- κ B la exponen Jayasooriya RGPT et al., 2015 (459), demostrando que este inositol es capaz de impedir la propagación de células cancerosas prostáticas a través de la inhibición de la vía de NF- κ B, disminuyendo en el proceso la expresión de proteínas como la metaloproteínasa de la matriz 9 (MMP-9), la cual es capaz de degradar componentes de la matriz extracelular facilitando la invasión de células malignas (417). En este sentido, otro efecto del D-Pinitol contra la migración e invasión de células tumorales es la disminución de la fosforilación de la proteína FAK (452), que presenta una actividad aumentada en muchos tipos de cáncer y favorece la angiogénesis tumoral (460).

A pesar de todas las evidencias que muestran las propiedades anticancerígenas del D-Pinitol, aún existen resultados controvertidos, principalmente en lo referente a su efecto sobre la proliferación celular. Mientras que hay autores que no han detectado este efecto (424), otros muestran que puede depender del tipo de ensayo o la concentración administrada (452), y algunos sí prueban que el D-Pinitol produce una inhibición de la proliferación y un estímulo de la apoptosis sobre células cancerosas (455).

En lo referente a la capacidad del D-Pinitol para prevenir el cáncer, aunque los resultados son escasos, sí hay algún estudio que expone un posible efecto protector (453). En cualquier caso, estos trabajos siguen mostrando un perfil seguro del D-Pinitol, y cabe mencionar que también se ha patentado su uso (y el del DCI) para el tratamiento y la prevención de la recaída del cáncer (461).

4.6.2.5. Como agente antiosteoporosis

El recambio óseo es un proceso normal del organismo, estando muy regulado, y siendo el resultado de un equilibrio entre la actividad de los osteoclastos (encargados de la reabsorción ósea) y los osteoblastos (encargados de la formación ósea). La osteoporosis aparece cuando este equilibrio se rompe en favor de los osteoclastos, con la consecuente disminución de la masa ósea y el deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, lo que conduce a una mayor fragilidad del hueso y, por lo tanto, al aumento del riesgo de fracturas (462,463). Este desequilibrio puede originarse por varias condiciones, como alteraciones hormonales, la aparición de ciertas enfermedades o el uso de algunos medicamentos (417).

En la reabsorción ósea asociada con la osteoporosis, las citoquinas proinflamatorias juegan un papel importante. De hecho, el ligando del receptor activador de NF- κ B (RANKL), una proteína que pertenece a la superfamilia TNF y que contribuye a controlar los procesos de regeneración del hueso, es una diana potencial para impedir la pérdida ósea; ya que una de sus principales funciones es la activación de los osteoclastos (417,464).

Se ha demostrado que el D-Pinitol es capaz de inhibir la formación de osteoclastos a través de una atenuación de la vía inducida por RANKL, disminuyendo la activación de p38, JNK y NF- κ B, y protegiendo así de la pérdida ósea. Por lo que el D-Pinitol tiene potencial para ser utilizado en el tratamiento y la prevención de la osteoporosis (464). De esta forma también se ha patentado una composición para la prevención y el tratamiento de trastornos del metabolismo óseo que presenta D-Pinitol como ingrediente activo (465).

4.6.2.6. Como hepatoprotector

Ya se mencionó anteriormente que, a través de sus propiedades antioxidantes, el D-Pinitol presenta un efecto protector de tejidos sensibles al estrés oxidativo como el hígado. Choi MS et al., 2009 (436), exponen como el D-Pinitol protege contra los efectos hepatotóxicos de una dieta rica en grasas y colesterol, actuando contra la peroxidación lipídica producida en hígado, además de reducir la actividad de enzimas hepáticas involucradas en hipercolesterolemia e inflamación.

Pero también existen estudios que reflejan un efecto hepatoprotector del D-Pinitol en diferentes circunstancias. En un modelo de rata donde se indujo daño hepático a través de una dieta alta en grasa y la administración de D-galactosamina (438), el D-Pinitol mostró un efecto protector del hígado, siendo capaz de disminuir la concentración plasmática de transaminasas hasta valores normales. Concretamente redujo los niveles de la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT), además de los de TNF- α . También fue capaz de prevenir la peroxidación lipídica en el hígado, atenuando los procesos inflamatorios y de estrés oxidativo promovidos por la D-galactosamina (438). Precisamente existe una patente para el uso del D-Pinitol y del DCI en la protección del hígado (466).

4.6.2.7. Como antisenescente

Al igual que se comentó brevemente en el apartado 4.1.4. “Vías canónicas de señalización del receptor de la insulina”, la longevidad está estrechamente relacionada con la actividad del factor de transcripción FOXO, que activa directamente la transcripción de genes de autofagia (Atg8a y Atg8b), así como genes implicados en la reparación del daño en el ADN, el metabolismo de la glucosa, la parada del ciclo celular (p27), la apoptosis (FasL) y enzimas antioxidantes (MnSOD); todos ellos muy relacionados con la reparación celular y la potenciación de la longevidad. El envejecimiento tanto natural como patológico generalmente se asocia con una autofagia reducida debido a un déficit de actividad de FOXO (107,108). La actividad transcripcional de FOXO está regulada por fosforilación en diferentes residuos de serina a través de las vías de las quinasas AKT, AMPK y MST/JNK. Así, por ejemplo, en respuesta a los estímulos de factores de crecimiento u hormonas como la insulina o IGF-1, la vía de Akt promueve la fosforilación de FOXO, lo que lleva a su unión a la proteína 14-3-3 y su permanencia en el citoplasma, de manera que esta fosforilación por Akt inhibe la acción de FOXO. Pero, en respuesta a una condición de baja energía, AMPK fosforila a FOXO y lo activa en el núcleo, favoreciendo la transcripción de sus genes diana; y también, en respuesta al estrés oxidativo, MST1/JNK fosforila a FOXO, lo que lleva a su translocación nuclear, su unión al ADN y la transcripción de sus genes diana (467). En definitiva, FOXO se inactiva por procesos relacionados con la ingesta y se activa con el ayuno y el estrés, lo que afecta al proceso de envejecimiento del cuerpo.

La restricción calórica, entendida como la reducción continua de la toma de nutrientes sin llegar al punto de desnutrición y manteniendo una alimentación adecuada, ha demostrado ser una estrategia eficaz para retrasar el envejecimiento y extender la esperanza de vida de forma saludable en múltiples organismos modelo, desde levaduras hasta primates (468,469).

En este sentido, el D-Pinitol (además del DCI) ha demostrado ser capaz de imitar el efecto de la restricción calórica, ya que el tratamiento con este inositol consiguió alargar considerablemente la esperanza de vida en un modelo de *Drosophila melanogaster*, tanto en machos como en hembras. Este efecto estuvo acompañado de una protección contra el estrés oxidativo, una disminución del estrés por hambre y una mejora en la salud; todo ello sin afectar a la fecundidad (470). Concretamente, en este trabajo proponen la activación de dFOXO como el mecanismo más probable de actuación, ya que se demostró su activación por parte del D-Pinitol a través del estímulo de las vías de señalización de S6K y JNK (470), y son ya

conocidas las funciones de dFOXO en el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la longevidad celular (417). Hay que destacar que el D-Pinitol aumentó la esperanza de vida en estas moscas, tanto en condiciones de restricción calórica como en condiciones *ad libitum*, lo que sugiere que los mecanismos subyacentes por los que el D-Pinitol (y el DCI) afecta a la activación de dFOXO y a la longevidad no pueden ser dependientes de la vía de Akt y merecen una mayor investigación.

Además de estos resultados, y como se comentó anteriormente, el D-Pinitol es capaz de reducir la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo, los cuales están estrechamente relacionados con el envejecimiento (471). Por lo que, aunando sus efectos en diferentes procesos biológicos, el D-Pinitol tiene un gran potencial para ser utilizado como ingrediente funcional en formulaciones geroprotectoras (417), y por este motivo existen varias patentes para proteger composiciones con cualidades antienvjecimiento en las que está presente el D-Pinitol (472–474).

4.6.2.8. Como antidiabético

De entre todas las aplicaciones farmacológicas del D-Pinitol, quizá la más descrita y estudiada sea su potencial como antidiabético. Como inositol que es, el D-Pinitol presenta propiedades **insulino-miméticas**, de las cuales ya se habló en el apartado 4.5.3.5. Ahora se desarrollará con más profundidad las implicaciones terapéuticas de esta cualidad.

Tradicionalmente se han usado productos naturales para el tratamiento de la diabetes, como las hojas de la buganvilla (*Bougainvillea spectabilis*) y del arbusto del cáncer (*Sutherlandia frutescens*), las semillas del fenogreco (*Trigonella foenum-graecum*), o los cladodios de la retama moruna (*Retama raetam*) (41,45,475–479); ahora se sabe que estos productos contienen elevadas cantidades de D-Pinitol, pudiendo ser este el principio activo antidiabético.

Se han realizado numerosos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, para evaluar las propiedades antidiabéticas del D-Pinitol y determinar su mecanismo de acción. En un principio, se demostró que este compuesto disminuye la hiperglucemia en un modelo de ratón diabético hipoinsulinémico (modelo generado por la administración de estreptozocina, que como ya se explicó provoca la destrucción de las células beta pancreáticas (41)). Pero no se observó este efecto ni en ratones normales ni en obesos-diabéticos severamente resistentes a la insulina (45). En este estudio también se señaló que el D-Pinitol interactúa con la ruta de señalización de la insulina a nivel de PI3K/Akt, produciendo un aumento de la captación de glucosa en células musculares L6 (45). Ya se comentó anteriormente la existencia de estudios *in vitro* (mioblastos L6) y *ex vivo* (músculo esquelético de rata) que demostraban que el tratamiento con D-Pinitol incrementa la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática y por lo tanto aumenta la captación de glucosa por parte del músculo (38). Sin embargo, este efecto no fue tan destacado como en trabajos previos (45), estas diferencias pueden ser debidas a la variabilidad entre los modelos y al momento en el que se administra el D-Pinitol con respecto a la glucosa (41).

Del mismo modo, en preadipocitos 3T3-L1, se encontró que el D-Pinitol podría actuar como un sensibilizador/mediador de la insulina a través de la regulación positiva de adiponectina, GLUT4, IRS o PPAR γ (480), aunque no se observó una reducción en la acumulación de lípidos. Estudios *in vivo* más recientes, en ratones C57BL/6, también demuestran que la administración oral (1 g/Kg de peso corporal) de D-Pinitol 30 min antes a la administración de glucosa (2 g/Kg de peso corporal) aumenta la translocación de GLUT4 hacia la membrana en el músculo esquelético, reduciendo aún más los niveles plasmáticos de glucosa e insulina (52).

También se ha demostrado la eficacia del D-Pinitol para controlar la glucemia en humanos. En pacientes con T2DM, el tratamiento con este compuesto durante 13 semanas disminuyó significativamente los niveles plasmáticos en ayunas de glucosa, insulina, fructosamina y HbA1c, de la misma forma produjo una mejoría del HOMA-IR y del perfil lipídico (46). En otro estudio, también sobre pacientes de T2DM, el consumo de D-Pinitol de manera aguda 60 min antes de la ingesta de arroz blanco cocido con un contenido de 50 g de carbohidratos, dio como resultado un menor aumento de la glucemia posprandial en comparación con los sujetos que solo tomaron el arroz; pero en este caso no se observó ningún efecto sobre los niveles de insulina (481). Asimismo, en sujetos sanos, una dosis única oral de D-Pinitol produjo, en comparación con el grupo placebo, un menor incremento de la glucemia y la insulinemia después de una sobrecarga oral de carbohidratos (47). Hay que decir que en este último trabajo solo se corroboró el efecto del D-Pinitol sobre la glucemia e insulinemia con la dosis más alta administrada (6 g).

Más recientemente, Bañuls C et al., 2016 (48), administraron durante 3 meses, a sujetos sanos, una bebida de vaina de algarroba que constituía una dosis diaria de 4,45 g de inositol, siendo el D-Pinitol el principal poliol. En comparación con un grupo de sujetos sanos que recibió una bebida endulzada con sacarosa, este estudio mostró que la bebida con D-Pinitol (con una cantidad total de azúcares similar) inducía una mejora significativa en parámetros relacionados con el metabolismo de los carbohidratos; exhibiendo una reducción de la glucemia posprandial, de la insulinemia y del índice HOMA-IR. De forma similar, este grupo también desarrolló otro estudio donde volvían a comparar el efecto del consumo, durante 3 meses, de la bebida de vaina de algarroba alta en D-Pinitol, con la bebida de sacarosa; con la diferencia de que esta vez los sujetos de estudio presentaban un estado prediabético (glucemia en ayunas alterada) (482). Se volvió a observar un efecto positivo de la bebida de algarroba sobre los niveles de glucosa, insulina y el índice HOMA-IR, pero este resultado fue más remarcado en los sujetos no obesos; por el contrario, los sujetos obesos solo mostraron una menor variación de los niveles de glucosa tras el ayuno nocturno, además de un descenso de los valores de algunas citoquinas proinflamatorias (482). Estos hallazgos sugieren que el D-Pinitol produce una respuesta dependiente del IMC, siendo más efectivo para disminuir los niveles de glucosa en pacientes con baja resistencia a la insulina, pero produciendo una marcada respuesta antiinflamatoria en sujetos obesos (482). Otras investigaciones también concuerdan con estos descubrimientos, en un contexto de prediabetes, la sustitución de una fuente de azúcar común (como la sacarosa) por una bebida endulzada rica en D-Pinitol, induce cambios en la vía de secreción de insulina que podrían ayudar a reducir los niveles de glucosa en sangre (483).

A pesar de todo lo desarrollado hasta ahora, en este punto hay que mencionar que existen investigaciones en humanos donde no se encontró un efecto beneficioso del D-Pinitol sobre la glucemia o la sensibilidad a la insulina, por un lado, el tratamiento con este ciclitol durante cuatro semanas no afectó a los niveles plasmáticos de glucosa en personas con obesidad y diabetes tipo 2 leve (49), por otro, en ancianos no diabéticos tampoco se apreció que el D-Pinitol influyera en el índice de tolerancia a la glucosa, la sensibilidad a la insulina o la activación del receptor de la insulina en el músculo esquelético (50,51). La ausencia de efectos clínicos del D-Pinitol sobre el metabolismo de la glucosa en estos trabajos podría explicarse por diferentes motivos: un elevado promedio del índice de masa corporal de los sujetos, diferencias en la fuente y el método de extracción del D-Pinitol, la pureza del compuesto, la dosis administrada, el intervalo de tiempo entre el consumo de D-Pinitol y la medición de la glucemia, la duración del tratamiento, o el tipo de población estudiada (41,48,50).

El D-Pinitol, al igual que otros inositoles, está estructuralmente relacionado con los diferentes fosfoinosítidos que pueden derivar del fosfatidilinositol, los cuales median en la acción de la insulina y estimulan la incorporación de glucosa al interior celular a través de la vía

de PI3K/Akt (Figura 2). Aunque los mecanismos por los que la suplementación exógena de D-Pinitol lleva a cabo sus efectos antidiabéticos, consiguiendo una reducción de la glucemia, aún no han sido completamente esclarecidos, la principal hipótesis se basa en una regulación de la ruta de señalización de la insulina. Y es que este inositol podría ejercer un efecto similar a la insulina en el transporte de glucosa de forma independiente a la propia hormona, actuando aguas abajo (posreceptor) en la vía de señalización de esta en miocitos y adipocitos (45,417).

Concretamente, según Gao Y et al., 2015 (53), el D-Pinitol desempeña un papel positivo en la regulación de la absorción de glucosa mediada por insulina en el hígado de ratas con T2DM, y lo consigue a través de la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt. En este estudio, mediante una dieta alta en grasas y la inyección de estreptozocina, se reprodujo un modelo de ratas diabéticas con resistencia a la insulina; y después de 5 semanas de tratamiento con D-Pinitol se encontró una disminución de la glucemia en ayunas, así como una mejoría de la tolerancia a la ingesta de glucosa. El análisis de proteínas clave en la ruta de señalización de la insulina en tejido hepático mostró que el D-Pinitol estimuló la expresión de PI3K (p85 y p110) y la fosforilación de Akt, además de producir una inhibición de GSK-3 β y una activación de GS, con el consecuente aumento de la síntesis de glucógeno (que a su vez ayudaría a disminuir los niveles de glucosa).

De forma parecida, se ha confirmado que la administración aguda de D-Pinitol induce una activación de PI3K/Akt y sustratos relacionados en el hipotálamo de un modelo de rata sana en ayunas, además de producir una disminución en la concentración circulante de insulina (64). Este estudio sugiere que el D-Pinitol podría ser un candidato para tratar trastornos cerebrales asociados a la resistencia a la insulina.

Pero más allá de este efecto sobre la vía PI3K/Akt, hay que destacar que el D-Pinitol también puede formar parte del segundo mensajero de la insulina INS-2, que, como se mencionó anteriormente, es un complejo formado por D-Pinitol y galactosamina que puede estar quelado con manganeso (Figura 11B) (36). Como ya se expuso (apartado 4.5.3.4.), la activación del receptor de la insulina promueve la acción de una fosfolipasa que puede hidrolizar los GPIs, dando lugar a INS-2, este segundo mensajero puede desencadenar lo que se conoce como ruta no canónica de la insulina (Figura 12), que tiene como resultado un aumento de la síntesis de glucógeno, un incentivo de la lipogénesis, un aumento del metabolismo oxidativo de la glucosa y un incremento de la entrada de glucosa a la célula. Por lo que, un refuerzo de la formación de INS-2 puede ser otro posible mecanismo antidiabético de la suplementación con D-Pinitol.

Los efectos beneficiosos del D-Pinitol en trastornos metabólicos no terminan en su **capacidad hipoglucemiante**, ya que esta se puede ver acompañada de una mejoría del sistema cardiovascular. De hecho, se ha propuesto que el D-Pinitol es capaz de reducir la presión arterial en ratón, a través de un efecto vasodilatador en la arteria mesentérica, dependiente del endotelio y del óxido nítrico (484).

Como muestran los estudios revisados, el D-Pinitol se presenta como un fármaco muy prometedor para el tratamiento de la diabetes, primero por su capacidad para reducir los niveles de glucosa en sangre, y segundo, por sus efectos positivos sobre otras complicaciones metabólicas asociadas a esta enfermedad (mejora en los perfiles lipídicos, atenuación del estrés oxidativo, disminución de factores proinflamatorios, o protección de los tejidos hepático, renal y pancreático). Por lo que el D-Pinitol también presenta una oportunidad para tratar otras dolencias relacionadas con la diabetes, a la vez que actúa sobre el principal foco de problemas, la hiperglucemia. Pero es importante tener presente que aún quedan incógnitas que desentrañar sobre sus mecanismos de acción, ya que ha quedado expuesto que la eficacia del tratamiento podría verse afectada en función de diferentes factores, como la obesidad, el nivel de resistencia a la insulina del paciente, la frecuencia de consumo, la dosis administrada o

el ciclo de ayuno/alimentación (41). Aun con todo, hay que remarcar que la administración de D-Pinitol es segura, ya que no se han reportado efectos adversos para la salud, además, aumenta la biodisponibilidad de este inositol en el organismo y claramente ayuda a controlar la glucemia tanto en pacientes de T2DM como en sujetos sanos, por lo que podría convertirse en un suplemento dietético de uso común. De hecho, como resultado del aumento de las investigaciones en el uso del D-Pinitol para el tratamiento de la diabetes y de las patologías asociadas a esta enfermedad, se han desarrollado varias patentes para proteger usos de este inositol en situaciones de T2DM (417,485–489).

4.6.2.9. Otras propiedades farmacológicas del D-Pinitol

Además de todos los ya descritos, El D-Pinitol exhibe otros efectos sobre una gran variedad de procesos biológicos, ampliando su potencial como agente farmacológico.

La ingesta conjunta de D-Pinitol y creatina parece mejorar la retención de esta última (490). Teniendo en cuenta las propiedades insulino-miméticas del D-Pinitol, y que la insulina facilita la captación de creatina, se podría explicar esta cualidad. Pero hay que remarcar que existe cierta controversia en este terreno, ya que diferentes dosis de D-Pinitol con creatina han arrojado resultados contradictorios (491). Debido a la capacidad de la creatina para mejorar el rendimiento deportivo (492), existe un potencial efecto amplificador del D-Pinitol; y aunque son necesarias investigaciones más profundas, ya se han generado un gran número de patentes en este campo (493–495).

El D-Pinitol también presenta potencial como agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer, mostrando una mejoría en modelos preclínicos de esta dolencia. Se cree que lo consigue a través de su actividad insulino-mimética, la modulación de la γ -secretasa y la reducción de la β -amiloide; aunque estos estudios aún se encuentran en una etapa preliminar (352,496). Siguiendo esta línea, existen composiciones con D-Pinitol patentadas para tratar la enfermedad de Alzheimer (497), incluyendo una derivada de los estudios de la presente tesis doctoral (498). Por otro lado, existen indicios que sugieren que el D-Pinitol, al regular la actividad de CDK5 a través de una disminución de CDK5R1, promueve la desfosforilación de la proteína tau (66). Ya que la forma hiperfosforilada de esta proteína tau contribuye a la muerte de las células neuronales, el D-Pinitol podría abrir una vía para desarrollar tratamientos contra trastornos neurológicos como las tauopatías.

Asimismo, se ha demostrado que el D-Pinitol inhibe el crecimiento de hongos patógenos en humanos (499), y, además, derivados de este inositol exhiben actividad antiviral (500).

El D-Pinitol también es el principal principio activo de *Eysenhardtia polystachya*, un árbol usado tradicionalmente en el tratamiento de infecciones, diarreas, inflamaciones y dolores (41), probándose su efecto antidiarreico (501).

Finalmente, incluso se ha corroborado un efecto protector del riñón en un modelo de nefrotoxicidad inducida, a través de la reducción del estrés oxidativo y del nivel de citoquinas proinflamatorias (413).

4.6.3. Retos para su uso

De acuerdo a todo lo descrito, queda claro que el D-Pinitol presenta una gran oportunidad para el tratamiento de diferentes dolencias. Sus efectos farmacológicos abarcan un amplio espectro de procesos biológicos, pero hay que destacar que muchos están interconectados entre sí, y confluyen en tres propiedades principales: el D-Pinitol es una sustancia antioxidante, antiinflamatoria y antidiabética. De hecho, situaciones de estrés

oxidativo, inflamación y diabetes pueden aparecer juntas y guardar una estrecha relación (502), además de ser las causantes de diferentes y variados problemas de salud; por lo que una sustancia que tenga poder para contrarrestar estos tres frentes, abre un importante abanico de posibilidades para su tratamiento. En este sentido, valdría la pena realizar más estudios que evalúen la actividad curativa/preventiva del D-Pinitol en diferentes enfermedades relacionadas con estos procesos, como por ejemplo la hepatitis, la artritis reumatoide, o el cáncer de páncreas, que presentan la diabetes como factor de riesgo (503,504).

Aunque las posibilidades que abre el uso este inositol son variadas, en este trabajo se pone el foco en sus efectos sobre el metabolismo de los carbohidratos. Estos ya han sido ampliamente estudiados en trabajos anteriores, pero las diferencias en la eficacia de los tratamientos, sumado a las incógnitas en sus mecanismos de acción, hacen necesaria una investigación más profunda. Hasta la fecha, la mayoría de los datos sobre los efectos del D-Pinitol se limitan a su papel atenuante de la hiperglucemia en escenarios experimentales diabéticos y/o en el periodo posprandial, de hecho, al comienzo de esta tesis doctoral aún no se había publicado una farmacocinética de este inositol. De igual forma, se necesitan más datos de la efectividad del D-Pinitol como tratamiento para la diabetes en pacientes que presentan diferentes comorbilidades, además de confirmar la seguridad de su uso a largo plazo (aunque por el momento no existe ningún indicio de lo contrario).

Hay que recordar que el D-Pinitol es un compuesto de origen natural, que se puede obtener de forma industrial a partir de plantas comunes, es fácilmente incorporado al organismo a través de la dieta y cuyos efectos podrían colocarlo como un sustituto más saludable de endulzantes que se usan en la elaboración de alimentos y bebidas. Por lo que otro reto que plantea el uso de este inositol, esta vez como complemento alimenticio, es comprobar cuales son los efectos que presenta cuando se administra en combinación con otras sustancias (como carbohidratos), si su absorción se ve afectada, y si mantiene sus propiedades farmacológicas. Además, habría que sumar cómo los diferentes escenarios que se pueden dar durante su administración afectan a las cualidades del D-Pinitol como suplemento, por ejemplo, la administración a un individuo sano frente a uno diabético.

Como se expuso al inicio de este trabajo, la diabetes y la obesidad son enfermedades con una estrecha relación. Hoy día presentan una alta prevalencia entre la población mundial, hasta el punto de ser consideradas una pandemia definida con el término de **diabesidad**, y las predicciones concluyen que esta prevalencia aumentará considerablemente en los próximos años. A esta situación hay que sumar el problema de los edulcorantes artificiales, sustancias que surgieron como una alternativa saludable a los endulzantes tradicionales, pero que en muchos casos han demostrado no contribuir a controlar la glucemia ni el peso corporal, y lo que es más preocupante, en los últimos años se han visto rodeados de polémica por la existencia de indicios que muestran un aumento del riesgo de sufrir diferentes dolencias.

En este contexto, el D-Pinitol supone una gran oportunidad para combatir la diabetes y la obesidad, tanto como tratamiento *per se*, como usado de forma preventiva, administrado en solitario o formando parte de preparados alimenticios. Aunque los datos disponibles hasta el momento son prometedores, el gran reto a conseguir es dilucidar por completo los mecanismos de acción del D-Pinitol, y de esta forma poder sacar el mejor provecho a este inositol.

Con este trabajo de tesis doctoral se pretende contribuir a lograr este objetivo, estudiando los efectos de la administración de D-Pinitol (en solitario y en conjunto con azúcares) en humanos y en un modelo animal de rata, en relación a determinadas acciones metabólicas desencadenadas y desconocidas hasta el momento. En los próximos apartados se detallan la hipótesis general y los objetivos de esta tesis doctoral, así como la consecución del trabajo de experimentación, los resultados obtenidos y las conclusiones finales.



5. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Uno de los principales desafíos en la lucha actual contra las epidemias de obesidad y T2DM es lograr un consumo correcto de hidratos de carbono en la dieta, tanto en cantidad, como en calidad, que minimice el riesgo de sufrir trastornos metabólicos (19). Hoy en día se utilizan un gran número de alimentos con azúcares añadidos o con un contenido excesivo de los mismos. Mas allá del potencial nutricional, la función de estos azúcares y edulcorantes en un alimento no es otra que lograr un alto grado de palatabilidad. En general, los alimentos altamente palatables contienen en su composición altos porcentajes de azúcar, grasa y sal, con el inconveniente añadido de que se consumen como respuesta al deseo de recompensa inmediata, sin que haya una necesidad de aporte calórico o una verdadera sensación de hambre. El reto actual no solo reside en revertir el consumo excesivo generalizado de azúcares añadidos en los alimentos procesados, sino también en lograr un correcto uso de determinados azúcares y compuestos no calóricos como los edulcorantes artificiales (20,21). Como se ha expuesto anteriormente, los problemas relacionados con la salud que están apareciendo en torno al uso de éstos últimos, los alejan de ser la solución para la epidemia de diabetes (290).

El objetivo y desafío es consumir alimentos que contengan endulzantes naturales que, conservando las propiedades palatables, logren mantener un equilibrio metabólico saludable. Esto se puede conseguir mediante el consumo de “alimentos funcionales” entendiendo como tales aquellos que además de su valor nutritivo, contienen componentes biológicamente activos que aportan algún efecto añadido y beneficioso para la salud y reducen el riesgo de contraer ciertas enfermedades. En este sentido, el uso de un alimento equilibrado en carbohidratos que aporte palatabilidad (endulzante) y que además porte en su composición un compuesto capaz de bajar el índice glucémico de estos carbohidratos, supone una alternativa saludable a los edulcorantes artificiales. Y aquí es donde los inositoles cobran importancia, ya que, sus efectos anteriormente descritos los convierten en sustancias a ser consideradas como ingredientes activos y funcionales para preparaciones de “endulzantes saludables” o formando parte de “alimentos funcionales”.

En apartados anteriores, se ha expuesto la importancia de los inositoles en el control del metabolismo de la glucosa, y se ha descrito cómo las alteraciones en sus niveles son evidentes en situaciones de resistencia a la insulina que conducen a T2DM (36). Además, la administración de algunos inositoles, como el DCI, el MI o el D-Pinitol, puede restaurar la sensibilidad normal a la insulina en algunas situaciones de resistencia a esta hormona (505). Debido a las variadas propiedades farmacológicas (especialmente su capacidad antidiabética, apartado 4.6.2.8.) que exhibe el D-Pinitol, se le considera un suplemento dietético beneficioso para prevenir la T2DM, y presenta las características idóneas para ser utilizado como ingrediente en endulzantes saludables.

A pesar de la amplia información que existe en la literatura sobre el D-Pinitol, no hay datos sobre su farmacocinética, y los mecanismos subyacentes al modo de acción de este inositol sobre el metabolismo de la glucosa y de los lípidos siguen sin ser del todo claros ni concluyentes. Además, tampoco existen datos suficientes sobre la dosis óptima, ni sobre la posibilidad de efectos tóxicos o indeseados tras un consumo prolongado. En la mayoría de los estudios en los que se administra D-Pinitol, no se ha tenido en cuenta el estado de ciclo postprandial o de ayuno a la hora de interpretar los resultados, dando lugar a conclusiones aparentemente contradictorias entre unos y otros estudios. De hecho, la información sobre los efectos de la administración del D-Pinitol en ayunas es prácticamente inexistente, y tampoco se conocen sus efectos sobre el control, no solo de la insulina, sino también sobre otras hormonas como glucagón, grelina, leptina, adiponectina o adrenalina, las cuales ejercen una alta repercusión en el metabolismo. Por tanto, teniendo en cuenta el impacto que el ciclo del ayuno/alimentación tiene sobre la glucemia e insulinemia, resulta crucial considerar el periodo del ciclo en el que se estudia un producto natural capaz de modular estos dos parámetros

metabólicos, a fin de interpretar con más precisión las consecuencias sobre los mismos. De igual modo, la administración aguda en periodo de ayunas permitiría analizar los efectos propios del D-Pinitol sin la intervención de otros nutrientes y hormonas, en especial la insulina, y así poder determinar si este inositol tiene capacidad insulino-mimética por sí mismo (activando elementos de la vía de la señalización del receptor para la insulina), o si, por el contrario, requiere de la intervención de la propia insulina para activar o incorporarse a una de sus vías de señalización. Por último, no existen datos sobre el proceso absortivo del D-Pinitol en presencia de competidores en el transporte intestinal, como la glucosa o la fructosa. Esta información es crucial para entender si se puede utilizar el D-Pinitol como elemento funcional añadido a una composición de mono/disacáridos como endulzantes.

Con todo lo detallado hasta el momento, en esta tesis doctoral se plantea la siguiente **hipótesis general**:

“La administración oral del compuesto natural D-Pinitol es segura a corto y largo plazo; es de rápida absorción y distribución en plasma e hígado, además es capaz de modular las acciones de la insulina dependiendo del estadio del ciclo ayuno/alimentación, lo que influye en la secreción de la propia insulina y de otras hormonas implicadas en la homeostasis de la glucosa, logrando así un impacto beneficioso tanto en el metabolismo glucídico como en el lipídico”.

Se propone también la siguiente **hipótesis secundaria**:

“El jarabe de algarroba, gracias a la presencia de D-Pinitol en su composición, manteniendo la palatabilidad y capacidad endulzante naturales proporcionadas por su contenido de glucosa y fructosa, presenta a la vez la ventaja de tener un índice glucémico mejor que el de estos monosacáridos administrados aisladamente. Además, por sus acciones farmacológicas, puede mejorar el metabolismo de carbohidratos y de lípidos, lo que lo convierte en un alimento funcional utilizable como endulzante alternativo de consumo bioseguro”.



6. OBJETIVOS

En base a las hipótesis enunciadas se plantean cinco objetivos generales, cada uno con sus objetivos específicos correspondientes.

Objetivo 1. Caracterizar la farmacocinética del D-Pinitol y comprobar la posible toxicidad tras su administración en ayunas en un modelo *in vivo* (rata), para posteriormente evaluar su impacto sobre el metabolismo glucídico y sobre las hormonas que lo regulan.

Objetivos específicos:

- 1.1. Analizar la farmacocinética del D-Pinitol en plasma y tejido hepático, así como determinar su toxicidad general en un modelo de rata.
- 1.2. Analizar el impacto que ejerce el D-Pinitol sobre la glucemia y secreción de insulina en un modelo de rata.
- 1.3. Analizar el impacto que ejerce el D-Pinitol sobre hormonas que regulan el metabolismo de la glucosa en un modelo de rata, incluyendo glucagón, leptina y grelina.
- 1.4. Examinar el impacto del D-Pinitol en componentes de la señalización del receptor de la insulina en tejido hepático en un modelo de rata.

Objetivo 2. Caracterizar en voluntarios humanos sanos en ayunas la farmacocinética y efectos endocrinos de la administración oral de D-Pinitol puro o como componente de un jarabe de algarroba natural.

Objetivos específicos:

- 2.1. Analizar y comparar las farmacocinéticas del D-Pinitol puro y como componente del jarabe de algarroba, monitorizando sus niveles en plasma humano tras su ingesta oral en ayunas.
- 2.2. Analizar el impacto que ejerce el D-Pinitol sobre la glucemia, la insulinemia y el HOMA-IR en plasma humano tras su ingesta oral en ayunas.
- 2.3. Examinar el impacto que ejerce el D-Pinitol sobre hormonas de la adenohipófisis, la grelina y el cortisol en plasma humano tras su ingesta oral en ayunas.

Objetivo 3. Evaluar los efectos de la administración oral de jarabe de algarroba sobre aspectos que controlan y se relacionan con la función metabólica de la insulina, para su consideración como endulzante natural en humanos obesos y/o diabéticos.

Objetivos específicos:

- 3.1. Analizar comparativamente el índice glucémico del jarabe de algarroba (que contiene fructosa, glucosa y D-Pinitol) con el de la glucosa (referencia) y con el del jarabe de agave (que contiene mayoritariamente fructosa) en voluntarios humanos sanos tras una ingesta aguda en ayunas.
- 3.2. Analizar el impacto que ejerce la ingesta aguda, en humanos sanos en ayunas, de jarabe de algarroba sobre los niveles de insulina, grelina y glucagón en plasma, comparándolo con el ejercido por la ingesta aguda de glucosa sola y de jarabe de agave.
- 3.3. Analizar el impacto que ejerce la ingesta aguda, en humanos sanos en ayunas, de jarabe de algarroba sobre los niveles de ácidos grasos libres en plasma, comparándolo con el ejercido por la ingesta aguda de glucosa sola.

Objetivo 4. Evaluar los efectos de la administración crónica de jarabe de algarroba (administrado en el agua de la bebida) sobre aspectos que controlan y se relacionan con la función metabólica de la insulina en plasma y tejido hepático de ratas Wistar, mantenidas bajo una dieta normal.

Objetivos específicos:

- 4.1.** Comprobar la glucemia de ratas Wistar en ayunas tras ingesta aguda de jarabe de algarroba, y compararla con la obtenida por la ingesta aguda de glucosa sola.
- 4.2.** Analizar el efecto de la administración crónica de jarabe de algarroba sobre parámetros bioquímicos en plasma que definen su toxicidad hepática y renal.
- 4.3.** Analizar el efecto de la administración crónica de jarabe de algarroba sobre aspectos relacionados con la función insulínica en plasma de ratas Wistar. Comprobar la tolerancia a la glucosa y los niveles de hormonas como grelina, glucagón, insulina y leptina.
- 4.4.** Analizar el efecto de la administración crónica de jarabe de algarroba sobre aspectos relacionados con la función insulínica en tejido hepático de ratas Wistar. Medir el contenido de glucógeno y grasa en hígado, la expresión y actividad de enzimas y sustratos implicados en la vía de señalización del receptor de la insulina, y la expresión génica de enzimas de la β -oxidación de ácidos grasos, la lipogénesis y la ruta gluconeogénica.

Objetivo 5. Evaluar los efectos de la administración crónica de jarabe de algarroba (administrado en el agua de la bebida) sobre aspectos que controlan y se relacionan con la función de la insulina en hipotálamo e hipocampo de ratas Wistar, mantenidas bajo una dieta normal.

Objetivos específicos:

- 5.1.** Analizar el efecto de la administración crónica de jarabe de algarroba sobre la expresión de enzimas implicadas en la vía de señalización del receptor para la insulina en hipotálamo e hipocampo en un modelo de rata Wistar, y determinar su potencial como alimento funcional beneficioso para frenar el deterioro cognitivo relacionado con la diabetes tipo 3.



7. METODOLOGÍA

Para la consecución de los diferentes objetivos propuestos, la metodología seguida durante el trabajo de experimentación fue la que se describe a continuación.

7.1. Preparación de fármacos

7.1.1. D-Pinitol

El compuesto D-Pinitol (3-O-Methyl-D-Chiro-inositol, 98% de pureza), cuyo nombre comercial es Caromax®-D-Pinitol, fue generosamente proporcionado por la compañía Euronutra S.L. (<https://www.euronutra.com/>, Málaga, España), en forma de polvo fino cristalino (lot: PPN-M0201).

7.1.2. Jarabe de algarroba

Para algunos estudios de este trabajo se usó jarabe de algarroba (InnoSweet®) fabricado y proporcionado por la compañía Euronutra S.L. Para la elaboración del jarabe se usa como materia prima vainas de algarrobo (*Ceratonia siliqua*), estas son molidas y mezcladas con agua caliente. Después de la filtración y separación cromatográfica, se obtiene un jarabe natural que contiene azúcares (incluyendo inositales) y se ajusta a 70 grados Brix (ver Tabla 2 para composición). Para preparar este jarabe se utilizan procesos físicos y separación cromatográfica, sin modificación química. Considerando la fracción de azúcar, la composición del lote utilizado para este trabajo fue de: 45,6% glucosa, 47,3% fructosa, 0,5% sacarosa y 3,2% D-Pinitol.

Tabla 2

	Valor	Comentarios
BRIX a 20 °C	69–71	ISO1743
DENSIDAD a 20 °C	1,35–1,36	g/cm ³
GLUCOSA	40	% materia seca
FRUCTOSA	45	% materia seca
SACAROSA	<5	% materia seca
D-PINITOL	>3	% materia seca
NO AZÚCARES	<2,5	% materia seca

Tabla 2. Composición del jarabe de algarroba (InnoSweet®).

7.1.3. Jarabe de agave

Jarabe de agave comercial vendido como edulcorante de mesa (Mercadona S.A., Tabernes Blanques, España) que contiene 77,2 g de carbohidratos/100 g, de los cuales más del 75% son fructosa.

7.2. Estudios en ratas

7.2.1. Declaración ética

Los procedimientos de experimentación con animales llevados a cabo para la elaboración de esta tesis doctoral se realizaron de acuerdo con la normativa comunitaria europea (2010/63/UE) y con la legislación española (Real Decreto 53/2013, BOE

34/11370-11421, 2013), además de ser aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga (España) de acuerdo con las directrices ARRIVE (506). En consecuencia, se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento animal y reducir el número de animales usados.

7.2.2. Animales

Los experimentos se realizaron con ratas Wistar macho de 4 a 5 meses de edad (CrI:WI(Han)) con un peso de 400 ± 20 g, adquiridas de Charles River Laboratories (Barcelona, España). Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales estándar (régimen de luz de 12/12 horas, día/noche) y bajo control de temperatura y humedad. Las ratas se alimentaron con una dieta de pellet estándar (STD: 3,02 Kcal/g con 30% Kcal de proteínas, 55% Kcal de hidratos de carbono y 15% Kcal de grasas) obtenida de Harlan Laboratories (Tecklad, Madison, WI, EE.UU.). El agua y la comida estaban disponibles *ad libitum*. Antes de ser sacrificados por decapitación, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso corporal) de manera intraperitoneal (i.p.).

7.2.3. Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT: Glucose Tolerance Test)

Para realizar esta prueba, los animales permanecieron en ayunas durante 18 horas antes de recibir una inyección i.p. de glucosa 2 g/Kg de peso corporal. Seguidamente se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola a tiempo 0 (nivel basal), 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 120 min después de la inyección, y las concentraciones de glucosa en sangre se midieron a tiempo real con un glucómetro comercial (AccuCheck, Roche, Alemania).

Para testar el efecto del D-Pinitol sobre la glucemia, los animales ($n = 8$) se trataron con una dosis de 100 mg/Kg de D-Pinitol (por sonda) 240 o 30 min antes de la inyección de glucosa y la posterior GTT. Como control se usó un grupo de animales ($n = 8$) al que solo se le administró la inyección con 2 g/Kg de glucosa.

7.2.4. Prueba de tolerancia a la insulina (ITT: Insulin Tolerance Test)

A animales en ayunas durante 18 horas se les administró una inyección i.p. de 0,75 unidades de insulina/Kg. Se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola a tiempo 0 (nivel basal), 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 120 min tras la inyección, y se midió la concentración de glucosa en sangre con un glucómetro comercial (AccuCheck, Roche, Alemania). La ITT se realizó a dos grupos de animales que habían recibido una dosis de 100 mg/Kg de D-Pinitol (por sonda), 1 o 2 horas antes de la inyección de insulina. Como controles se usaron un grupo de animales que solo recibió la inyección de insulina de 0,75 unidades/Kg, y un grupo que solo recibió una inyección de suero salino.

7.2.5. Recolección de muestras

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se recogieron muestras de sangre, hígado y cerebro.

La sangre se centrifugó (2100 g durante 8 min a 4 °C) y el plasma obtenido se mantuvo a -80 °C hasta los posteriores análisis bioquímicos. Las muestras de hígado y cerebro se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido o hielo seco, y después fueron almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento y análisis.

7.2.6. Medición de metabolitos y hormonas en plasma e hígado

7.2.6.1. Metabolitos plasmáticos

Se midieron los siguientes metabolitos plasmáticos: glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, bilirrubina, triglicéridos; y las enzimas hepáticas: aspartato aminotransferasa (AST) (también llamada glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT)), alanina aminotransferasa (ALT) (también llamada glutamato-piruvato transaminasa (GPT)), y gamma-glutamyl transferasa (GGT). Para estas mediciones se utilizaron kits comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante y un analizador automático Hitachi 737 (Hitachi Ltd., Tokio, Japón).

7.2.6.2. Hormonas asociadas a la homeostasis de la glucosa y citoquinas en plasma

Estas mediciones se llevaron a cabo usando la técnica de “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas” o ELISA (de sus siglas en inglés: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Para ello se usaron kits comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante: leptina, adiponectina, insulina y grelina (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU., referencia: #EZRL-83K, #EZRADP-62K, #EZRMI-13K y #EZRGRT-91K, respectivamente); glucagón (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU., referencia: RAB0202-1KT); e IGF-1 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU., referencia: ERIGF1). Todas las muestras de plasma se analizaron por duplicado en un mismo ensayo y los resultados se expresan en relación a un estándar propio de cada hormona.

7.2.6.3. Índices HOMA

Con los datos de insulina y glucosa previamente obtenidos, se calculó los índices HOMA (modelo de evaluación de la homeostasis), tanto para valorar la presencia de resistencia a la insulina (HOMA-IR) como para evaluar la actividad del páncreas (HOMA-β). Para ello se siguieron las siguientes fórmulas:

- HOMA-IR: (insulina en ayunas ($\mu\text{UI/mL}$) $\times$ glucosa en ayunas (mmol/L)) / 22,5.
- HOMA-β: (20 $\times$ insulina en ayunas ($\mu\text{UI/mL}$)) / (glucosa en ayunas (mmol/L) – 3,5).

7.2.6.4. Estrés oxidativo

Con el objetivo de monitorear la presencia en plasma de estrés oxidativo, se evaluó la peroxidación lipídica, usando para ello el método TBARS (sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico). Se utilizó un kit comercial específico (Cell Biolabs Inc, San Diego, CA, EE.UU., referencia: STA-330) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió el malondialdehído (MDA), que es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica, separado de un endoperóxido de ácidos grasos insaturados resultante de la oxidación de sustratos lipídicos y por tanto un biomarcador de estrés oxidativo.

7.2.6.5. Cuerpos cetónicos

Los niveles plasmáticos de cuerpos cetónicos se midieron por determinación de la presencia de beta-hidroxibutirato, utilizando un kit comercial (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU., referencia: MAK041) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron en relación a los estándares proporcionados por el kit.

7.2.6.6. Glucógeno en hígado

Los niveles de glucógeno en hígado se midieron con un kit comercial (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU., referencia: MAK016), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y los resultados se expresaron en relación a los estándares proporcionados por el kit.

7.2.6.7. Contenido de lípidos totales en hígado

La extracción de grasa del tejido hepático se realizó según el método (modificado) de Bligh y Dyer (507,508). Se extrajeron los lípidos totales de muestras de hígado congeladas, utilizando cloroformo-metanol (2:1, v/v) y butilhidroxitolueno (0,025%, p/v). Luego, se llevaron a cabo dos pasos de centrifugación (2800 g, 10 min a 4 °C) y se extrajo la fase inferior donde se encuentran los lípidos. Cada muestra se secó utilizando nitrógeno y el contenido de grasa del hígado se calculó restando el peso del tubo vacío al peso del mismo tubo que ya contiene los lípidos. Los datos se expresan como porcentaje del peso del tejido.

7.2.7. Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

Secciones de hígado (50–80 mg) se homogeneizaron en hielo y se extrajo el ARN total del tejido usando el método Trizol® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA, EE.UU.). Las muestras de ARN se aislaron utilizando el kit RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, y fueron cuantificadas usando un espectrofotómetro Nanodrop TM ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) para garantizar una ratio A260/280 de 1,8 a 2,0. Se llevó a cabo la transcripción inversa a partir de 1 µg de ARNm en un volumen de reacción de 20 µL en total, usando qScript XLT cDNA SuperMix (Quantabio, Beverly, MA, EE.UU.).

7.2.8. qPCR en tiempo real y análisis de expresión génica

La técnica de qPCR en tiempo real se realizó siguiendo las directrices MIQE (509). Las reacciones se llevaron a cabo en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96TM (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Adaptando lo descrito en la bibliografía (510), cada muestra de ADNc fue amplificada en un volumen de 10 µL de reacción, conteniendo 4,5 µL de ADNc (previamente diluido 1/100, es decir, una cantidad total de 2,25 ng de ADNc por reacción) y 5,5 µL de PerfeCTa qPCR ToughMix (Quantabio, Beverly, MA, USA, EE.UU.) incluyendo el cebador correspondiente.

Los cebadores específicos para los genes de rata estudiados: *Fbp1* (fructosa-1,6-bisfosfatasa 1), *G6pc* (glucosa-6-fosfatasa subunidad catalítica), *Pc* (piruvato carboxilasa), *Pck1* (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1), *Pklr* (piruvato quinasa), *Fasn* (ácido graso sintasa), *Acox1* (acil-coenzima A oxidasa 1), *Acaca* (acetil-coenzima A carboxilasa 1 alfa), *Cox4i1* (isoforma 1 de la subunidad IV de la citocromo c oxidasa), *Cox4i2* (isoforma 2 de la subunidad IV de la citocromo c oxidasa), *Scd1* (estearil-coenzima A desaturasa 1), *Cpt1a* (carnitina palmitoiltransferasa 1a), *Actb* (beta actina) y *Gapdh* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) se muestran en la Tabla 3. Todos los cebadores se obtuvieron en base a ensayos de expresión génica TaqMan® y con el formato de fluorescencia FAM™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Cada reacción se realizó por duplicado. Los parámetros de los ciclos fueron: 50 °C durante 2 min para desactivar el ADN monocatenario y bicatenario que contiene dUTPs, 95 °C durante 10 min para activar la Taq ADN polimerasa, seguido de 44 ciclos a 95 °C durante 15 s para la fusión de ADNc y a 60 °C durante 1 min para permitir la hibridación y la extensión de los cebadores, durante el cual se adquirió la fluorescencia. Se utilizó la media de los duplicados para la cuantificación relativa. La expresión de los genes *Actb* y *Gapdh* no se vio afectada durante todos los tratamientos experimentales. *Actb* fue el gen elegido como referencia y la cuantificación relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (511). Todos los resultados están normalizados con respecto al grupo de control.

Tabla 3

Nombre del gen	Identificación	Nº acceso GenBank	Longitud del amplicón
Genes Objetivo			
<i>Fbp1</i>	Rn00561189_m1	NM_012558.3	77
<i>G6pc</i>	Rn00689876_m1	NM_013098.2	64
<i>Pc</i>	Rn00562534_m1	NM_012744.2	97
<i>Pck1</i>	Rn01529014_m1	NM_198780.3	87
<i>Pklr</i>	Rn01455286_m1	NM_012624.3	58
<i>Fasn</i>	Rn01463550_m1	NM_017332.1	148
<i>Acox1</i>	Rn01460628_m1	NM_017340.2	63
<i>Acaca</i>	Rn00573474_m1	NM_022193.1	60
<i>Cox4i1</i>	Rn00665001_g1	NM_017202.1	72
<i>Cox4i2</i>	Rn00585003_m1	NM_053472.1	59
<i>Scd1</i>	Rn00594894_g1	NM_139192.2	86
<i>Cpt1a</i>	Rn00580702_m1	NM_031559.2	64
Genes de referencia			
<i>Gapdh</i>	Rn01775763_g1	NC_005103.4	174
<i>Actb</i>	Rn00667869_m1	NM_031144.3	91

Tabla 3. Referencias de cebadores para ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems).

7.2.9. Extracción de proteínas y análisis de Western Blot

A partir de secciones de hígado, hipotálamo e hipocampo (17 mg de peso promedio) se extrajo la proteína total, para ello, estas secciones de tejido se homogeneizaron en 1 mL de tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (a 4 °C) que presenta en su composición: Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, NaDOC al 0,5%, EDTA 1 mM, Triton al 1%, SDS al 0,1%, Na3VO4 1 mM y NaF 1 mM; suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche, referencia: 11836145001) y de fosfatasas (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set III, Millipore, referencia: 524527). La suspensión se incubó durante 2 horas a 4 °C en agitación, tras lo cual se centrifugo a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se utilizó el método colorimétrico de Bradford para determinar la concentración de la proteína total. Los extractos proteicos se diluyeron 1:1 en tampón de carga (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0,2 M ditiotretol (DTT), 0,02% azul de bromofenol) y se calentaron durante 5 min a 99 °C antes de someterlos a electroforesis.

Se cargaron 50 µg de proteína total en geles comerciales para electroforesis: 4–12% (Bis-Tris) Criterion XT Precast Gels (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU., referencia: 3450124), y, después de separar las proteínas por su peso molecular (aplicando 80 V durante 30 min, seguidos de 2 horas a 120 V), fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU., referencia: 1620115). Para la detección de proteínas

específicas, la membrana se bloqueó durante 1 hora en solución salina tamponada con tris y Tween 20 (polisorbato 20) (TBS-T) con un 2% de albúmina de suero bovino (BSA). Después, la membrana se incubó durante una noche con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-T con BSA al 2%. Los datos de los anticuerpos primarios usados se muestran en la Tabla 4. Los anticuerpos primarios se detectaron usando un anticuerpo secundario conjugado con HRP, anti-conejo o anti-ratón, según la procedencia animal del anticuerpo primario (Promega, Madison, WI, EE.UU., referencia: W4011 y W4021, respectivamente). Las proteínas específicas se revelaron utilizando el reactivo de detección ECL™ Prime Western Blotting System (GE Healthcare, Chicago, IL, EE.UU., referencia: RPN 2236), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las imágenes se visualizaron usando el equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU.). Después de medir las proteínas fosforiladas, los anticuerpos específicos se eliminaron de la membrana mediante incubación con un tampón de extracción (2% SDS, 62,5 mM Tris-HCL pH 6,8, 0,8% β -mercaptoetanol) durante 30 min a 50 °C. Las membranas se lavaron profusamente en agua ultrapura y luego se volvieron a incubar con el correspondiente anticuerpo específico para la proteína total.

La cuantificación de las imágenes obtenidas se realizó mediante el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>, Bethesda, Maryland, EE.UU.). El nivel de señal específico de las proteínas totales se normalizó al nivel de señal de la banda de γ -adaptina (proteína de referencia) correspondiente de cada muestra en la misma membrana. El nivel de fosforilación de una proteína se expresó como la ratio de la señal obtenida con el anticuerpo fosfo-específico en relación con la señal del anticuerpo de proteína total respectivo. La cantidad de proteína de interés en las muestras de control se fijó arbitrariamente en 1.

Tabla 4

Anticuerpo primario	Especie	Casa comercial (referencia)	Dilución
Akt	Conejo	Cell Signaling (#9272)	1:1000
phospho(Ser473)-Akt	Conejo	Cell Signaling (#9271)	1:1000
GSK-3 α	Conejo	Cell Signaling (#4337)	1:1000
GSK-3 β	Conejo	Cell Signaling (#12456)	1:1000
phospho(Ser21)-GSK-3 α	Ratón	Cell Signaling (#9337)	1:1000
phospho(Ser9)-GSK-3 β	Conejo	Cell Signaling (#5558)	1:1000
phospho(Tyr279/Tyr216)-GSK-3 α/β	Ratón	Merck Millipore (#15648)	1:1000
IRS-1	Conejo	Cell Signaling (#3407)	1:1000
phospho(Ser612)-IRS-1	Conejo	Cell Signaling (#3203)	1:1000
phospho(Tyr896)-IRS-1	Conejo	Abcam (#ab46800)	1:1000
GS	Conejo	Cell Signaling (#3886)	1:1000
phospho(Ser641)-GS	Conejo	Cell Signaling (#3891)	1:1000
mTOR	Conejo	Cell Signaling (#2972)	1:1000
phospho(Ser2448)-mTOR	Conejo	Cell Signaling (#2971)	1:1000
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Conejo	Cell Signaling (#4695)	1:1000
phospho(Thr202/Tyr204)-p44/42 MAPK (Erk1/2)	Conejo	Cell Signaling (#9101)	1:1000
Tau	Ratón	Abcam (#ab203179)	1:1000
phospho(Ser202, Thr205)-Tau [AT8]	Ratón	Thermo Fisher (#MN1020)	1:1000
γ -adaplin	Ratón	BD Biosciences (610385)	1:2000

Tabla 4. Referencias de anticuerpos usados en los ensayos de Western Blot.

7.3. Estudios en humanos

7.3.1. Sujetos de estudio

Se reclutaron un total de 25 voluntarios entre el personal de laboratorio y el personal clínico del Laboratorio de Neuropsicofarmacología del Hospital Regional Universitario de Málaga, todos sanos. Los criterios de inclusión para todos los sujetos fueron:

- Rango de edad de 18 a 65 años.
- La presencia de una glucosa en sangre capilar de $<5,6$ nmol/L (100 mg/mL) después de un ayuno nocturno.
- La ausencia de obesidad (IMC menor de 30) y la ausencia de cualquier enfermedad metabólica diagnosticada o tratada.

Los sujetos fueron entrevistados para detectar algún diagnóstico actual o pasado de diabetes (glucosa $> 7,8$ mmol/L después de una carga de glucosa estándar), hipertrigliceridemia o hipercolesterolemia, así como por antecedentes clínicos de trastornos

endocrinos, incluida la disfunción de la glándula tiroides o el tratamiento con glucocorticoides. Los criterios de exclusión fueron embarazo o lactancia, glucemia en ayunas >5,6 mmol/L (100 mg/dL), insulinemia en ayunas determinada por ELISA (>25 mUI/L), diabetes o el uso de algún medicamento del cual se conozca que interfiera con el metabolismo de los carbohidratos. Todos los estudios se realizaron en condiciones de ayuno (ayuno nocturno durante 12 h). Ninguna de las mujeres incluidas tomó medicación anticonceptiva. Los estudios se realizaron bajo las directrices de la Declaración de Helsinki, y el protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Regional Universitario de Málaga, con el número de protocolo P18-TP-5194. Los principales datos sobre los participantes masculinos y femeninos se pueden encontrar en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5

Variables	Hombres	Mujeres
<i>Subestudio con D-Pinitol¹</i>		
N	9	7
Edad (años)	41,5 ± 13,8	37,2 ± 14,8
Peso (Kg)	84,6 ± 6,2	70,2 ± 16,2
Índice de Masa Corporal (IMC)	28,1 ± 3,1	25,1 ± 4,9
Glucosa basal (mg/dL)	82,5 ± 13,1	77,6 ± 9,6
Insulina basal (mIU/L)	3,6 ± 1,2	3,5 ± 2,1
HOMA-IR	0,70 ± 0,44	0,71 ± 0,49
<i>Subestudio con jarabe de algarroba</i>		
N	5	4
Edad (años)	37,7 ± 12,2	34,3 ± 11,6
Peso (Kg)	84,6 ± 9,5	66,6 ± 12,4
Índice de Masa Corporal (IMC)	27,2 ± 3,7	23,6 ± 4,0
Glucosa basal (mg/dL)	81,8 ± 14,8	78,8 ± 8,4
Insulina basal (mIU/L)	3,5 ± 1,4	2,95 ± 1,8
HOMA-IR	0,66 ± 0,28	0,58 ± 0,36

Tabla 5. Características de los voluntarios que participaron en el estudio con D-Pinitol y jarabe de algarroba. Los datos se expresan como media ± desviación estándar.¹Grupo combinado de voluntarios para dosis de 15 y 5 mg/Kg de D-Pinitol.

Tabla 6

Variables	Hombres	Mujeres
N	13	10
Edad (años)	37,7 ± 12,2	34,3 ± 11,6
Peso (Kg)	84,6 ± 9,5	66,6 ± 12,4
Índice de Masa Corporal (IMC)	27,2 ± 3,7	23,6 ± 4,0
Glucosa basal (mg/dL)	81,8 ± 14,8	78,8 ± 8,4
Insulina basal (mIU/L)	3,5 ± 1,4	2,95 ± 1,8
HOMA-IR	0,66 ± 0,28	0,58 ± 0,36

Tabla 6. Características de los voluntarios que participaron en el estudio con glucosa, jarabe de algarroba y jarabe de agave. Los datos se expresan como media ± desviación estándar.

7.3.2. Recolección de muestras de sangre, preparación de plasma y monitoreo de la concentración de glucosa y fructosa

Después de un ayuno nocturno de 12 h, se insertó un catéter en la vena antecubital de cada sujeto, se extrajo sangre al inicio (minuto 0, aún en ayunas) e inmediatamente después (en menos de 5 min) se suministró, por ingesta oral, las dosis asignadas de glucosa, jarabe de algarroba, jarabe de agave, o D-Pinitol (5 o 15 mg/Kg). Luego, se recolectaron muestras de sangre a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min después de la ingesta, también se extrajo sangre a los 180, 240, 360 y 1440 min después de la ingesta, pero solo en el caso del grupo administrado con D-Pinitol 15 mg/Kg. En el caso de la dosis de D-Pinitol de 5 mg/Kg, solo se extrajo sangre a los 0, 60 y 120 min después de la ingesta, para comparar con la absorción observada con dosis más altas. A los individuos se les permitió comer 6 horas después de la primera extracción de muestra. Todas las muestras de sangre se recolectaron en tubos Vacutest (Vacutest Kima S.r.l., Arzergrande, PD, Italia, referencia: #13560) y se centrifugaron a 2000 g durante 10 min a 4 °C; el plasma obtenido se mantuvo a -80 °C para los posteriores análisis bioquímicos. Las concentraciones de glucosa en plasma se midieron con un glucómetro comercial (AccuCheck, Roche, Alemania).

Los puntos de tiempo entre 0 min (basal) y 180 min se usaron para las medidas relacionadas con la homeostasis de la glucosa. Solo se utilizaron los puntos de tiempo 0, 60, 120 y 180 min para el análisis de las concentraciones de hormonas pituitarias, gonadotropinas y cortisol. Se utilizaron todos los puntos temporales para medir la concentración de D-Pinitol en sangre.

Para las mediciones de fructosa, se desproteinizaron 0,15 mL de plasma mezclándolos con un volumen igual de ácido perclórico al 20% a 4 °C. Las muestras se agitaron y se centrifugaron durante 15 min a 2500 rpm. Los sobrenadantes se inyectaron con HPLC acoplada a un detector de índice de refracción para monitorear la fructosa, utilizando una curva de calibración estándar externa se calculó las concentraciones. El sistema de HPLC constaba de una columna de μ Bondapak/carbohidrato, un sistema disolvente de acetonitrilo/agua (75:25) y un caudal de 1,8 mL/min.

7.3.3. Medición de concentraciones plasmáticas de metabolitos y hormonas

7.3.3.1. Hormonas que regulan la homeostasis de la glucosa

Los niveles plasmáticos de hormonas que regulan la homeostasis de la glucosa se determinaron mediante el método ELISA, utilizando kits comerciales para muestras humanas: insulina (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU., referencia: #EZHI-14K), glucagón (Elabscience Biotechnology Inc, Wuhan, Hubei, China, referencia: #E-EL-H2237), grelina activa (Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, EE.UU., referencia: #KT-364). Todas las mediciones se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones específicas de cada fabricante. Todas las muestras se analizaron por duplicado dentro de un mismo ensayo y los resultados se expresan en términos del estándar proporcionado en cada kit.

7.3.3.2. Ácidos grasos libres en plasma

Se usó un kit comercial para determinar la concentración plasmática de ácidos grasos libres (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU., referencia: MAK044), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se analizaron por duplicado dentro de un mismo ensayo y los resultados se expresan en términos del estándar proporcionado en cada kit.

7.3.3.3. Cuerpos cetónicos

Los niveles plasmáticos de beta-hidroxibutirato se midieron con un kit comercial (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU., referencia: MAK041), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron por duplicado dentro de un mismo ensayo y los resultados se expresan en términos del estándar proporcionado en cada kit. Mientras que las concentraciones de β -cetona en plasma se determinaron usando un medidor comercial (GlucoMen® areo 2K, A. Menarini Diagnostics, Badalona, Barcelona, España) y las tiras reactivas correspondientes (GlucoMen® areo β -Ketone Sensor, A. Menarini Diagnostics, Badalona, Barcelona, España).

7.3.3.4. Índice glucémico y HOMA

Para calcular el índice glucémico, de cada sujeto experimental que recibió glucosa, jarabe de algarroba o jarabe de agave, se obtuvo el área bajo la curva (AUC) del % de variación de la glucosa plasmática sobre los niveles basales versus el tiempo después de la ingesta. El AUC promedio para el grupo glucosa se normalizó a 100 y el índice glucémico de los grupos jarabe de algarroba y jarabe de agave es obtenido como % sobre el AUC del grupo glucosa.

La resistencia a la insulina se evaluó siguiendo el índice HOMA-IR, calculado usando la siguiente fórmula (512):

- $\text{HOMA-IR} = (\text{insulina en ayunas } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{glucosa en ayunas } (\text{mmol/L})) / 22,5.$

La actividad de las células β del páncreas se evaluó siguiendo el índice HOMA- β , usando la siguiente fórmula (512):

- $\text{HOMA-}\beta = (360 \times \text{insulina en ayunas } (\mu\text{UI/mL})) / (\text{glucosa en ayunas } (\text{mg/dL}) - 63).$

Con los valores de insulina y glucagón previamente obtenidos, se calculó la ratio glucagón/insulina.

7.3.3.5. Hormonas pituitarias y gonadotropinas

Los niveles plasmáticos de las hormonas pituitarias y gonadotropinas: hormona foliculoestimulante (FSH, expresados en mUI/mL), hormona del crecimiento humano 1 (GH, expresados en ng/mL), hormona luteinizante (LH, expresados en mUI/mL), prolactina (PRL, expresados en ng/mL) y hormona estimulante de la tiroides (TSH, expresados en $\mu\text{UI/mL}$), fueron determinados por el sistema de inmunoensayo multiplex, usando para ello el kit comercial Bio-Plex Pro™ RBM Human Hormone Panel 1 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU., referencia: #171AHR1CK), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las mediciones se realizaron con un equipo Bio-Plex MAGPIX™ Multiplex Reader con el software Bio-Plex Manager™ MP (Luminex, Austin, TX, EE.UU.). Los límites de detección fueron: 0,11 mUI/mL (FSH), 0,0076 ng/mL (GH), 0,061 mUI/mL (LH), 0,022 ng/mL (PRL) y 0,012 $\mu\text{UI/mL}$ (TSH).

7.3.3.6. Cortisol

Los niveles de cortisol en plasma se determinaron utilizando un kit comercial (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EE.UU., referencia: 500360) siguiendo las instrucciones del fabricante. La preparación del plasma se realizó según lo recomendado por el kit, y los resultados se expresaron en términos del estándar proporcionado.

Las absorbancias obtenidas se analizaron utilizando una hoja de cálculo proporcionada por el mismo fabricante, disponible en <https://www.caymanchem.com/analysisTools/ELISA> (consultado el 22 de marzo de 2022).

7.4. Cuantificación de D-Pinitol: método de cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC/MS)

7.4.1. Método de espectrometría de masas

Las concentraciones plasmáticas y hepáticas de D-Pinitol fueron medidas por la Fundación MEDINA (Parque Tecnológico de Las Ciencias de la Salud, Granada, España), tras optimizar el proceso extractivo de D-Pinitol en cada una de las matrices (plasma y homogenado de hígado). Para la medición se validó un método mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). El análisis se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) y un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Api4000 (SCIEX). La cuantificación se obtuvo usando el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) de las transiciones en m/z 195.2 $\rightarrow$ 109.0 (cuantitativo) y 195.2/80.0 (cualitativo) para D-Pinitol, ambos con energía de colisión a 20 eV y m/z 261.1 $\rightarrow$ 205.1 para el estándar interno (IS) (ver Figura 13A y 13B). Las condiciones de espectrometría de masas fueron: potencial de desagrupamiento (DP): 10 eV; GS1 y GS2: 45 psi; T^a: 600 °C; y spray de iones: 5500 eV. Las condiciones cromatográficas fueron: la fase móvil (MP) consistía en ácido fórmico al 0,1% - [agua: AcN] [90:10] (MP A) y ácido fórmico al 0,1% - [AcN: agua] [90:10] (MP B). El programa de gradiente se aplicó de la siguiente manera: t = 0-0,5 min 95% MP B; t = 4,50-6,70 min 25% MP B; t = 6,80 min 95% MP B; t = 6,80– 9,00 min 95% MP B. El caudal fue de 0,3 mL/min y el tiempo de ejecución fue de 9 min. El volumen de inyección fue de 5 μ L. La columna cromatográfica utilizada fue XBridge BEH Amide Column (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU., referencia 186004860) con unas dimensiones de 2,1 $\times$ 100 mm y un tamaño de partícula de 3,5 μ m. La columna del horno se mantuvo a 30 °C.

7.4.2. Validación del método para la cuantificación de D-Pinitol

Las curvas de calibración fueron lineales en el rango de concentración de 0,31 a 20 μ g/mL. El coeficiente de correlación (r^2) fue de 0,9963 para la curva de calibración en el análisis (Figura 13C). Se ha conseguido desarrollar un método analítico para la cuantificación de D-Pinitol mediante el uso de espectrometría de masas, con un límite inferior de cuantificación de 313 ng/mL y un límite inferior de detección de 200 ng/mL. El rendimiento del método se validó de acuerdo con las recomendaciones de la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) propuestas en 2018 para selectividad, sensibilidad, efecto matriz, linealidad, precisión, exactitud y recuperación de muestras de plasma (513). La medición de polioles cíclicos mediante espectrometría de masas y HPLC-DAD es complicada debido a la mala ionización y respuesta (514), sin embargo, este método mostró buena sensibilidad y selectividad para cuantificar D-Pinitol en muestras de plasma.

7.4.3. Preparación de muestra

Se tomó una alícuota de 50 μ L de plasma y se añadió un 2% de ácido trifluoroacético (TFA), más 150 μ L de metanol frío que contenían el estándar interno. Después de mezclar con vórtex durante 1 min, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 13300 rpm a una temperatura de 4 °C. Se transfirió 160 μ L del sobrenadante a un vial para evaporación. Las muestras se reconstituyeron en 100 μ L de agua/acetonitrilo (80/20) y amoníaco al 0,1% (20%) para el análisis LC/MS.

7.4.4. Estudio farmacocinético

Todos los parámetros farmacocinéticos se estimaron a partir de los valores de concentración medios determinados en cada punto temporal y se evaluaron mediante análisis no compartimental utilizando el software PKSolver (Versión 2.0) (515).

Figura 13

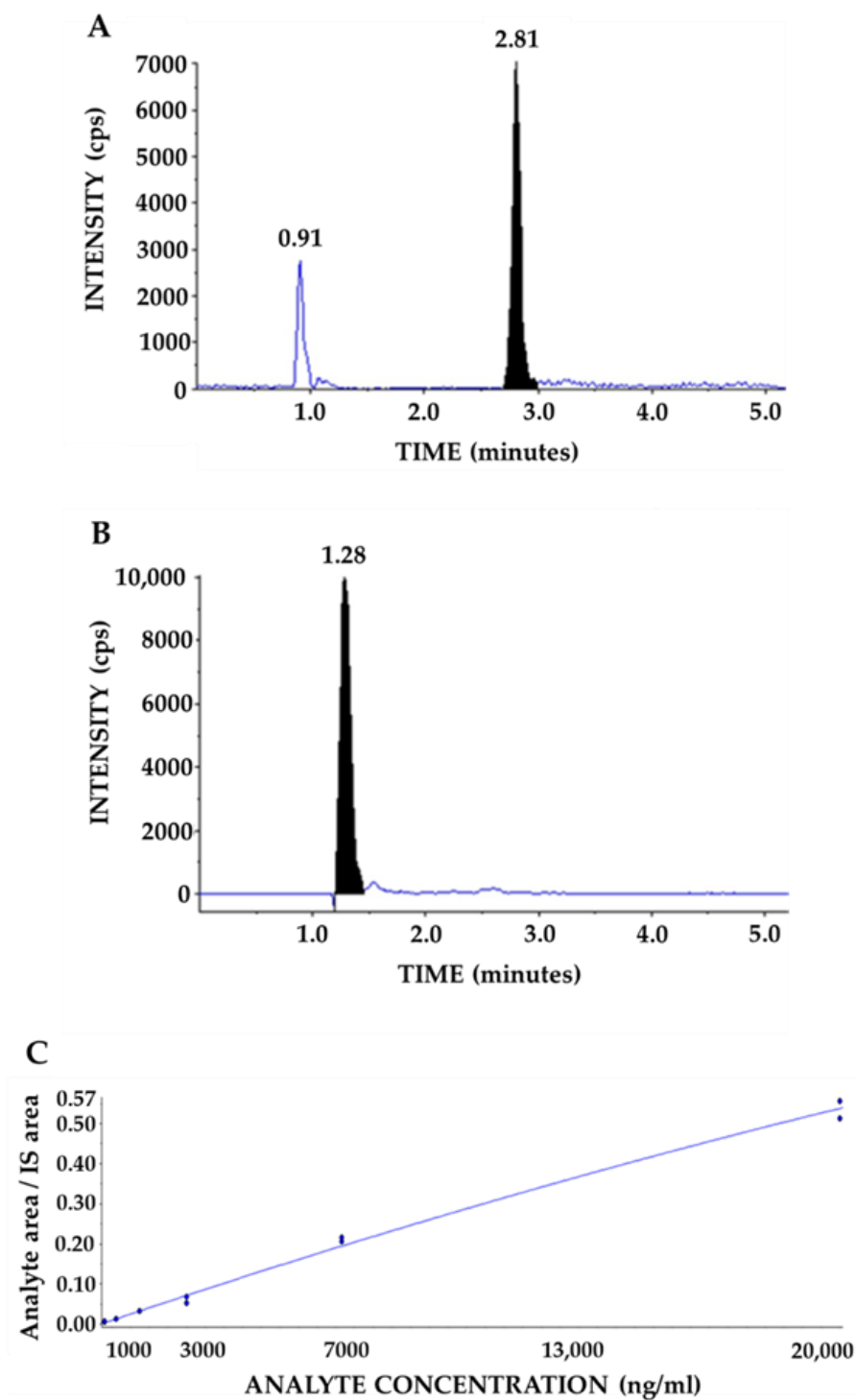


Figura 13. Cromatograma de D-Pinitol (A) y estándar interno (IS) (B) en muestra plasmática en MRM. Curva de calibración de D-Pinitol en muestras de plasma (rango 0,31–20 $\mu\text{g/mL}$) (C).

7.5. Cultivo celular y diseño experimental *in vitro*

Se cultivaron células β INS-1E de insulinoma de rata en medio de cultivo completo que contenía: RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 5% (GIBCO), piruvato de sodio 1 mM (GIBCO), glutamina 2 mM (GIBCO), 2-mercaptoetanol 50 μ M (GIBCO), HEPES 10 mM (Lonza Group, Basilea, Suiza), penicilina 100 UI/mL y estreptomicina 100 mg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.); a 37 °C y en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ (516). Para los experimentos, las células se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en placas de 12 pocillos con 2 mL de medio completo hasta alcanzar el 80% de confluencia. Luego, se cambió el medio y las células se mantuvieron en 1 mL de medio completo y se estimularon con glucosa 3 mM u 11 mM (solución de D-(+)-glucosa) durante 15 h. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con medio completo libre de glucosa y se incubaron durante 2 horas en este medio. Tras esta incubación, los cultivos celulares se lavaron dos veces con tampón bicarbonato HEPES de Krebs-Ringer sin glucosa (KRBH; 135 mM NaCl, 3,6 mM KCl, 5 mM NaHCO₃, 0,5 mM NaH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, 1,5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES y BSA 0,1%, pH 7,4). A continuación, las células se incubaron en 500 μ L de KRBH con 3 mM u 11 mM de glucosa (dependiendo del grupo experimental), y se estimularon durante 30 min con diferentes concentraciones de D-Pinitol (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M y 1000 μ M). Los grupos de células control se mantuvieron en KRBH sin glucosa, en KRBH con 3 mM de glucosa, o en KRBH con 11 mM de glucosa. La incubación se detuvo colocando las placas en hielo.

Se recogieron los sobrenadantes y se midió su contenido de insulina mediante kit ELISA (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU., referencia: #EZRM1-13K).

Para la extracción de lisado de proteínas, se utilizó tampón RIPA 1X (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU., referencia: R0278) y cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basilea, Suiza, referencia: 11 697 498 001). Las muestras se congelaron y descongelaron a -80 °C dos veces, posteriormente, se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C, se recogieron los sobrenadantes y se disgregaron en tampón de carga con SDS y DTT (para composición, ver apartado 7.2.9.), por último, se calentaron a 99 °C durante 5 min para someterlas a SDS-PAGE. Se usó la técnica de Western Blot para el análisis proteico, como se describió previamente en el apartado 7.2.9. de la metodología de este trabajo.

7.6. Análisis estadístico

Se utilizó el software Graph-Pad Prism 6.0 y 8.0 para analizar los datos (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.). Los valores se representan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) para cada grupo experimental, con un tamaño muestral que varía según el ensayo. La significancia de las diferencias dentro y entre los grupos se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una o de dos vías (dependiendo del ensayo), seguido de una prueba post-hoc para comparaciones múltiples. Alternativamente, para las comparaciones entre solo dos grupos, también se usó una prueba t de Student. En caso de que los datos no tuvieran una distribución normal, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, como se indica. Un valor $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, y los símbolos más usados para representar las diferencias significativas fueron: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.



8. RESULTADOS

Durante este trabajo de tesis doctoral se ha pretendido ampliar los conocimientos sobre los efectos biológicos del consumo oral de D-Pinitol y su impacto en la salud. Para ello, se ha procedido a la realización de varios estudios que han dado respuesta a los **cinco objetivos** que se enunciaron en el apartado 6. En el **primer estudio** se lleva a cabo la caracterización farmacocinética del D-Pinitol en un modelo animal, seguida de una comprobación de los efectos sobre el metabolismo de la glucosa, complementando los hallazgos con ensayos *in vitro*. En un **segundo estudio** se realiza un análisis en humanos, paralelo al realizado en animales, donde se describe la farmacocinética del D-Pinitol cuando se administra puro o como ingrediente de un jarabe, y se analizan los efectos metabólicos y endocrinos de la toma de este compuesto puro sobre determinadas hormonas de interés y ácidos grasos libres en plasma. Un **tercer estudio** incluye una investigación de los efectos del D-Pinitol como ingrediente de un jarabe natural de algarroba tanto en un modelo animal de rata como en un modelo humano; este jarabe constituye un endulzante natural que, además de glucosa y fructosa, contiene D-Pinitol en su composición, por lo que se analiza las posibles ventajas de la presencia del inositol en este jarabe frente a otros jarabes endulzantes comerciales, calculando el índice glucémico y midiendo diversos parámetros metabólicos.

La realización de estos tres estudios ha generado una serie de resultados que han sido publicados en tres artículos científicos y que se resumen a continuación.

8.1. Primera publicación. “D-Pinitol from *Ceratonía siliqua* is an orally active natural inositol that reduces pancreas insulin secretion and increases circulating ghrelin levels in Wistar rats”

Publicado en *Nutrients*. Julio 2020; 12(7): 2030.

Recibido: 31 mayo 2020; Aceptado: 6 julio 2020; Publicado: 8 julio 2020.

Autores: **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 y Fernando Rodríguez de Fonseca.

PMID: 32650579, PMCID: PMC7400942, DOI: **10.3390/nu12072030**.

Referencia bibliográfica: Navarro JA, Decara J, Medina-Vera D, Tovar R, Suarez J, Pavón J, Serrano A, Vida M, Gutierrez-Adan A, Sanjuan C, et al. D-Pinitol from *Ceratonía siliqua* Is an Orally Active Natural Inositol That Reduces Pancreas Insulin Secretion and Increases Circulating Ghrelin Levels in Wistar Rats. *Nutrients*. 2020; 12(7):2030. <https://doi.org/10.3390/nu12072030>.

Resumen: Para caracterizar las acciones metabólicas del D-Pinitol, un inositol que se puede incorporar a través de la dieta, en ratas Wistar macho, se analizó su farmacocinética tras administración oral y sus efectos sobre: a) la secreción de hormonas reguladoras del metabolismo (insulina, glucagón, IGF-1, grelina, leptina y adiponectina); b) la señalización de la insulina en el hígado; y c) la expresión de enzimas glucolíticas y gluconeogénicas. La administración oral de D-Pinitol (100 o 500 mg/Kg) dio lugar a una rápida absorción y distribución en los compartimentos plasmático y hepático. Su administración redujo la insulinemia y el HOMA-IR, al tiempo que mantenía la glucemia gracias al aumento de la actividad del glucagón. En el hígado, el D-Pinitol redujo la expresión de la enzima glucolítica piruvato quinasa, y disminuyó la fosforilación de las enzimas Akt y GSK-3. Estas observaciones se asociaron a un aumento de las concentraciones de grelina, un conocido inhibidor de la secreción de insulina. El perfil metabólico obtenido tras la administración de D-Pinitol sugiere su uso potencial como protector pancreático, ya que disminuye la secreción de insulina a

través de la regulación de la grelina, al tiempo que mantiene la glucemia constante a través de mecanismos hepáticos de control de la glucólisis.

Abstract: To characterize the metabolic actions of D-Pinitol, a dietary inositol, in male Wistar rats, we analyzed its oral pharmacokinetics and its effects on (a) the secretion of hormones regulating metabolism (insulin, glucagon, IGF-1, ghrelin, leptin and adiponectin), (b) insulin signaling in the liver and (c) the expression of glycolytic and neoglucogenesis enzymes. Oral D-Pinitol administration (100 or 500mg/Kg) resulted in its rapid absorption and distribution to plasma and liver compartments. Its administration reduced insulinemia and HOMA-IR, while maintaining glycaemia thanks to increased glucagon activity. In the liver, D-Pinitol reduced the key glycolytic enzyme pyruvate kinase and decreased the phosphorylation of the enzymes AKT and GSK-3. These observations were associated with an increase in ghrelin concentrations, a known inhibitor of insulin secretion. The profile of D-Pinitol suggests its potential use as a pancreatic protector decreasing insulin secretion through ghrelin upregulation, while sustaining glycaemia through the liver-based mechanisms of glycolysis control.

8.1.1. Síntesis de resultados de la primera publicación

En este artículo se da respuesta al **primer objetivo** propuesto, a saber:

Caracterizar la farmacocinética del D-Pinitol y comprobar la posible toxicidad tras su administración en ayunas en un modelo in vivo (rata), para posteriormente evaluar su impacto sobre el metabolismo glucídico y sobre las hormonas que lo regulan.

Para la consecución de este objetivo se siguieron los correspondientes objetivos específicos anteriormente formulados (apartado 6), además del diseño experimental de tratamiento *in vivo* con D-Pinitol 100 y 500 mg/Kg en un modelo de rata Wistar macho que se refleja en la Figura 14.

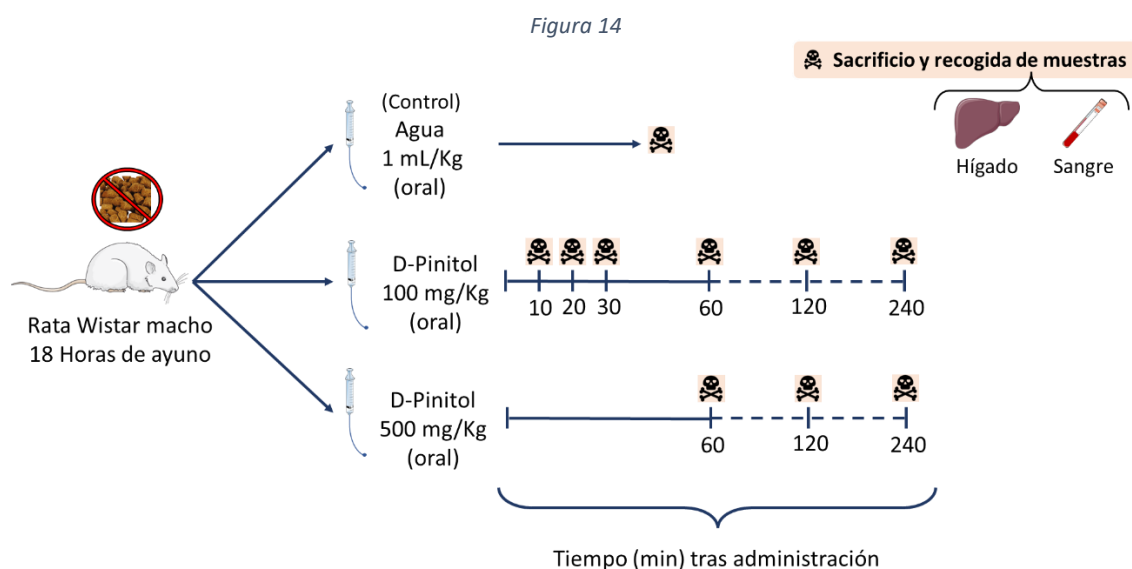


Figura 14. Esquema del diseño experimental para el análisis de la farmacocinética y toxicidad de la administración oral de D-Pinitol en ratas Wistar macho. Partes de la figura se diseñaron utilizando imágenes de Servier Medical Art. Servier Medical Art de Servier está licenciado bajo Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

8.1.1.1. Análisis farmacocinético de la absorción, distribución y eliminación del D-Pinitol en plasma e hígado en un modelo de rata Wistar

Siguiendo el diseño experimental mencionado en la Figura 14, y mediante un análisis farmacocinético, se comprobó que el D-Pinitol mostró una rápida absorción y detección tanto en plasma como en hígado **tras una única toma oral de 100 mg/Kg**. El D-Pinitol aparece de forma temprana en suero (10 min) y en hígado (20 min) presentando una concentración máxima (C_{max}) a los 60 y 120 min respectivamente (T_{max}) (Figura 1 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). Además, los tiempos de aclaramiento en plasma e hígado resultaron ser bastante rápidos, mostrando una vida media (t_{1/2}) de 108 min en plasma y de 154 min en hígado (Figura 1 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). Una vez establecida la farmacocinética para una dosis de 100 mg/Kg de D-Pinitol, se procedió a experimentar con una dosis oral más alta, de 500 mg/Kg (Figura 14), observándose una C_{max} en plasma e hígado a los 120 min y mostrando también una eliminación rápida.

8.1.1.2. Comprobación de la toxicidad de las dosis de D-Pinitol administradas en un modelo de rata Wistar

El análisis de biomarcadores de toxicidad mostró una buena bioseguridad del D-Pinitol en este modelo de rata Wistar. La administración de D-Pinitol (100 mg/Kg, Figura 14) no provocó concentraciones plasmáticas de ácido úrico, creatinina o urea indicativas de toxicidad renal (Tabla Suplementaria 2 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). Asimismo, las medidas de concentraciones plasmáticas de bilirrubina y de las enzimas hepáticas AST/GOT y ALT/GPT resultaron normales, por lo que la ingesta de D-Pinitol tampoco afectó negativamente a la función hepática a esa concentración (Tabla Suplementaria 2 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*).

Con la administración de una dosis de 500 mg/Kg de D-Pinitol (Figura 14), los niveles plasmáticos de creatinina, urea y de la transaminasa hepática AST/GOT resultaron incluso más bajos que en el grupo control. No obstante, aumentaron los niveles de ALT/GPT a los 240 min tras la administración (Tabla Suplementaria 3 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). A pesar de esta última observación, el análisis global de estos resultados indicó que el D-Pinitol puede considerarse seguro para los compartimentos de hígado y riñón tras una sola administración oral, a las concentraciones de 100 y 500 mg/Kg.

8.1.1.3. Impacto de la administración de D-Pinitol sobre la secreción de insulina y glucagón

Siguiendo con el orden de objetivos específicos y el mismo diseño experimental mostrado en la Figura 14, se pudo comprobar que la administración de una única dosis de D-Pinitol a ratas Wistar en ayunas, tanto a concentración de 100 mg/Kg como de 500 mg/Kg, redujo de forma significativa los niveles plasmáticos de insulina al tiempo que aumentó los de glucagón (Figura 2 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*).

Bajo estas circunstancias, la evaluación de la resistencia a la insulina por el índice HOMA-IR indicó una disminución del mismo tras la administración aguda de D-Pinitol, revelando que el tratamiento con este inositol aumenta la sensibilidad a la insulina en ayunas, lo que está en consonancia con la disminución de los niveles de esta hormona.

Por otro lado, una serie de experimentos *in vitro* sobre células β INS-1E de insulinoma de rata, bajo dos condiciones de concentración de glucosa diferentes: glucosa basal y alta concentración de glucosa (Figura 15), demostraron que el D-Pinitol inhibía la secreción de insulina en estas células, y por tanto mostrando una acción directa de ese inositol sobre la célula β (Figura 3 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). Además, se comprobó que la

fosforilación de las quinasas ERK1/ERK2, normalmente inducida por alta concentración de glucosa y responsable de la secreción de insulina (56), se redujo drásticamente en presencia de varias concentraciones de D-Pinitol (Figura 4 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). Por lo tanto, estos resultados no solo van en la misma dirección que los obtenidos *in vivo*, donde el D-Pinitol reduce los niveles de insulina en plasma, sino que además indican que este inositol probablemente inhiba directamente la secreción de insulina en el páncreas.

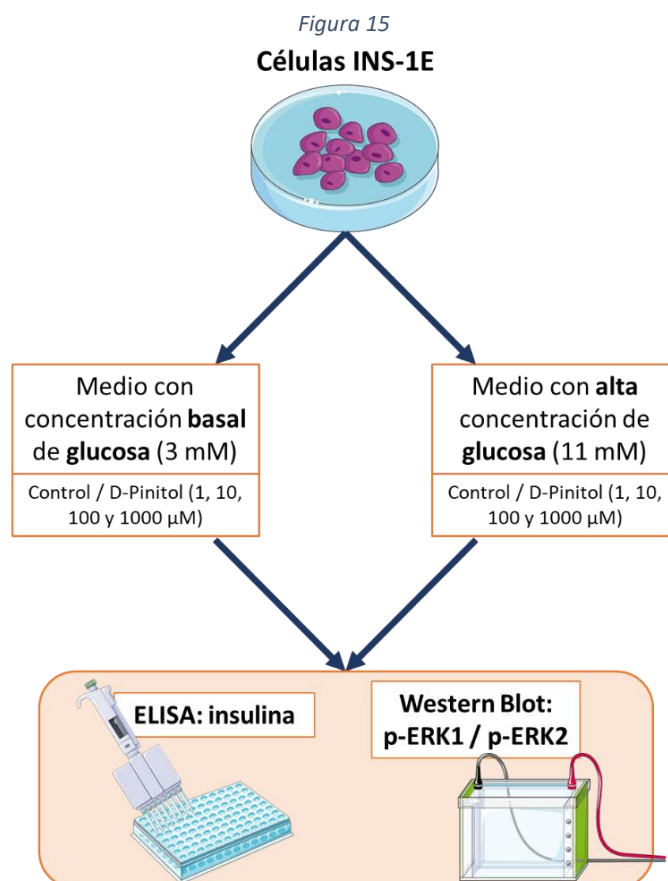


Figura 15. Esquema del diseño experimental del estudio para el análisis de la secreción de insulina en cultivos de células β INS-1E en presencia de D-Pinitol. Partes de la figura se diseñaron utilizando imágenes de Servier Medical Art. Servier Medical Art de Servier está licenciado bajo Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

8.1.1.4. Análisis del efecto del D-Pinitol sobre la tolerancia a glucosa e insulina en ratas Wistar

A continuación, se procedió a analizar el efecto del D-Pinitol sobre la tolerancia a glucosa e insulina mediante ensayos GTT e ITT (descritos en la sección 7.2.3. y 7.2.4. de la metodología).

Ratas Wistar en ayunas recibieron una dosis oral de 100 mg/Kg de D-Pinitol 30 min o 240 min antes de someterse a una prueba de GTT (Figura 16A). Los resultados mostraron que el grupo que recibió D-Pinitol 30 min antes de la prueba, con respecto al grupo control, sufrió un retraso en el tiempo necesario para la disminución de la glucemia (Figura 5A de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*), lo que sugiere intolerancia a la glucosa en este grupo; si bien la eficacia en la reducción de la glucemia fue similar a la del grupo control desde los 45 min hasta los 120 min, lo que indica que la intolerancia a la glucosa observada fue transitoria (Figura 5A de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). No se observaron diferencias importantes entre el grupo

que recibió D-Pinitol 240 min antes de la GTT y el grupo control (Figura 5A de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*).

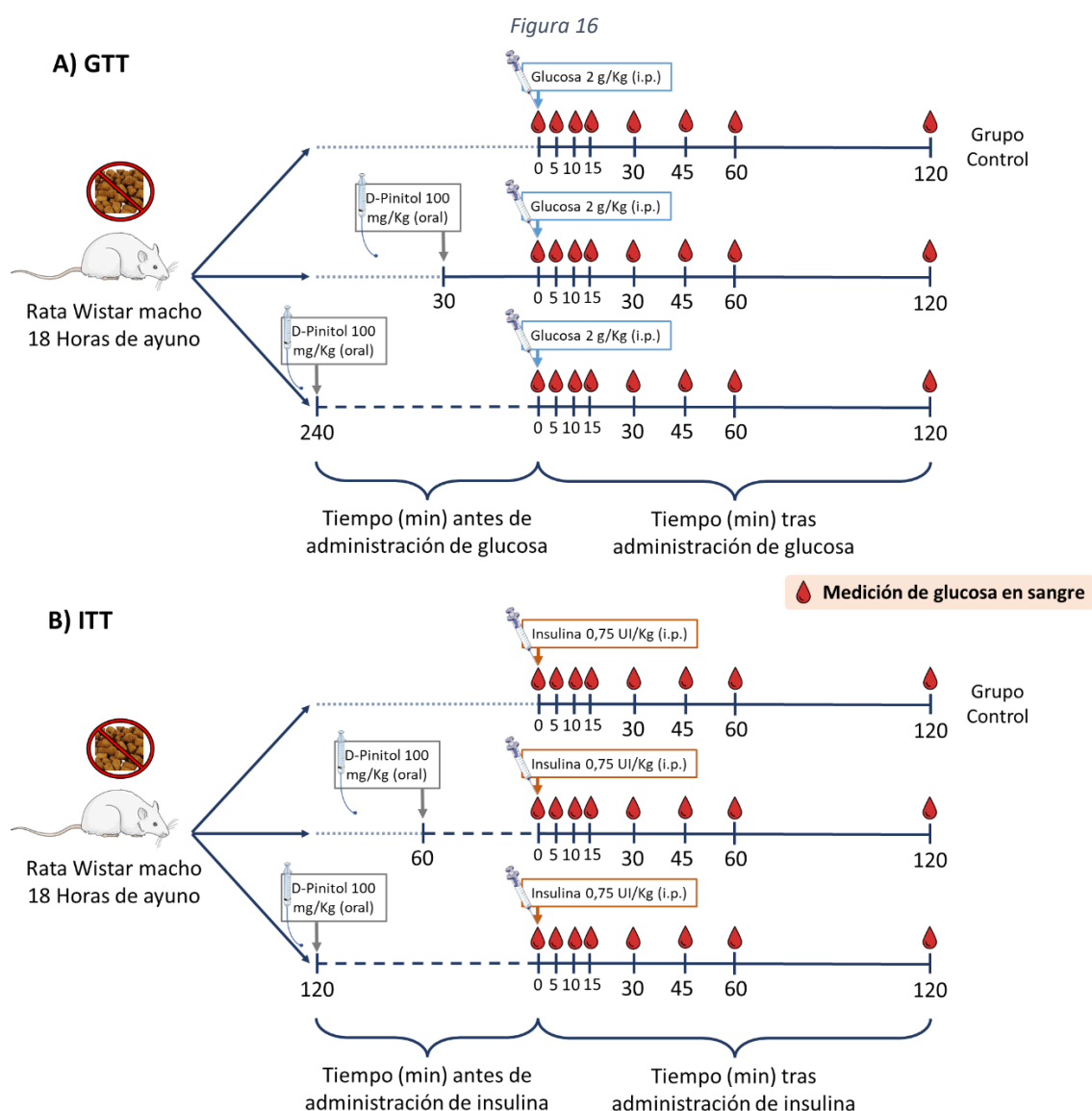


Figura 16. Esquema del diseño experimental del estudio para el análisis de **A:** GTT y **B:** ITT, en ratas Wistar macho en ayunas, con la administración previa de D-Pinitol. Partes de la figura se diseñaron utilizando imágenes de Servier Medical Art. Servier Medical Art de Servier está licenciado bajo Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Por otro lado, se realizó una prueba de tolerancia a la insulina (ITT) en ratas Wistar en ayunas, tratadas con D-Pinitol 60 o 120 min antes de recibir la carga de insulina (Figura 16B). Esta prueba mostró que el grupo tratado con D-Pinitol 60 min antes de la ITT, manifestó una menor capacidad para aclarar la glucosa en sangre (a los 45, 60 y 120 min) respecto al grupo control (que solo recibió la administración de insulina exógena) (Figura 5B de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). Estos resultados están en línea con los presentados anteriormente en relación al efecto inhibitorio del D-Pinitol sobre las células β para secretar insulina endógena, por lo que es razonable que los animales que recibieron D-Pinitol 60 min antes a la administración de insulina exógena mostraran cierta dificultad para aclarar la glucosa con respecto a aquellos que no recibieron D-Pinitol, ya que presentarían una menor cantidad de insulina endógena al inicio de la prueba. No obstante, este hecho ya no se observó en el grupo que recibió D-Pinitol 120 min antes de la ITT, lo que sugiere que el efecto del D-Pinitol sobre la

tolerancia a la insulina es **rápido, transitorio y discreto**. De hecho, no se observó ninguna diferencia estadística entre el AUC del grupo control con insulina exógena solo y el AUC de los grupos tratados con D-Pinitol (Figura 5B de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*).

8.1.1.5. Impacto del D-Pinitol sobre enzimas y hormonas que regulan el metabolismo de la glucosa en ratas Wistar

Siguiendo con los objetivos específicos establecidos y el diseño experimental mostrado en la Figura 14, se estudió la expresión génica de enzimas clave que controlan la gluconeogénesis en el hígado (*Fbp1*, *Pck1* y *G6pc*). Este análisis reveló que no había alteraciones significativas en la expresión génica de estas enzimas en ninguno de los tiempos medidos tras la administración de D-Pinitol 100 mg/Kg (Figura Suplementaria 1 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). Por el contrario, el análisis de la expresión génica de la enzima glucolítica piruvato quinasa (*Pklr*), mostró una clara y sostenida inhibición de la transcripción a partir de los 10 min tras la administración de D-Pinitol, con una tendencia a recuperar los niveles normales a partir de los 60 min (Figura 6 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). Esta última observación podría indicar que el tratamiento oral con D-Pinitol en ayunas reduce la glucólisis en hígado, lo que favorecería la acción del glucagón, y, por tanto, desviando el metabolismo hepático hacia una liberación activa de glucosa. Esto se analizó de forma más detallada posteriormente.

Un examen de los efectos del D-Pinitol sobre la concentración plasmática de hormonas que modulan tanto el metabolismo de la glucosa como la respuesta de la insulina, reveló que las concentraciones de adiponectina, leptina o IGF-1 no se vieron afectadas después de la administración aguda de D-Pinitol 100 mg/Kg a ratas Wistar en ayunas (datos no mostrados en publicación). Sin embargo, el análisis de los niveles plasmáticos de grelina mostró que una sola dosis de D-Pinitol aumentaba significativamente estos niveles a los 10 min tras la administración, y en proporción a la concentración de D-Pinitol administrada (100 y 500 mg/kg), con una clara tendencia a mantener los niveles de grelina por encima de los niveles basales (Figura 7 y Figura suplementaria 2 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). Este hallazgo resulta importante porque indica que el efecto del D-Pinitol sobre el páncreas es tanto directo como indirecto, ya que la grelina es una hormona que inhibe la secreción de insulina en células β pancreáticas (54).

8.1.1.6. Estudio del impacto del D-Pinitol en componentes de la vía de señalización del receptor de la insulina en tejido hepático

Por último, se analizó el efecto del D-Pinitol sobre la vía de señalización del InsR. En hígado de ratas Wistar en ayunas, tratadas con D-Pinitol (500 mg/Kg) (Figura 14), el examen del estado de los componentes de la vía de señalización del receptor para la insulina, mostró que IRS-1 presentaba una disminución de la ratio entre la fosforilación activadora de residuos de tirosina y la fosforilación inhibitoria de residuos de serina (Figura 8 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*), lo que es sinónimo de una baja actividad. De igual forma, el análisis del estado de la fosforilación activadora de la proteína Akt, y de la fosforilación inhibitoria de su sustrato, GSK-3 β , mostró en ambos casos una disminución bajo el tratamiento agudo con D-Pinitol (500 mg/Kg) a los 60 min tras la administración (Figura 9 de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*), lo que se traduce en un aumento transitorio de la actividad de la quinasa GSK-3 β . Estos resultados apuntan a un estado de hipoactividad del InsR agudizado por el D-Pinitol.

Estas observaciones de la ruta de señalización de la insulina (IRS-1/Akt/GSK-3 β) en hígado son compatibles con la reducción en la secreción de insulina observada después de la administración de D-Pinitol en ayunas.

8.1.2. Conclusiones de resultados de la primera publicación

- a) El análisis farmacocinético del D-Pinitol administrado en un modelo de rata Wistar en ayunas muestra una rápida absorción, distribución y eliminación tanto en plasma como en hígado; sin exhibir signos de toxicidad. Por tanto, es un **producto seguro**.
- b) El D-Pinitol **inhibe la secreción de insulina** en células β INS-1E de forma directa. Este hecho es compatible con la observación de que la administración de D-Pinitol en un modelo de rata Wistar en ayunas reduce de forma significativa los niveles basales de insulina en plasma, lo que lleva a la sugerencia de que *in vivo* el D-Pinitol también inhibe la secreción de insulina en páncreas.
- c) La administración de D-Pinitol en un modelo de rata Wistar en ayunas **aumenta los niveles de grelina** en plasma, hormona también conocida por inhibir la secreción de insulina en páncreas.
- d) El D-Pinitol administrado en un modelo de rata Wistar en ayunas induce **intolerancia a la glucosa y a la insulina**, pero **de forma discreta y transitoria**, efectos compatibles con su acción inhibitoria sobre la secreción de insulina endógena.
- e) Las anteriores conclusiones permiten considerar al D-Pinitol como un producto natural de gran valor **páncreo-protector**, tanto si ejerce su efecto inhibitorio en la secreción de insulina de forma directa como a través de la grelina.
- f) El D-Pinitol administrado en ayunas repercute **negativamente en la glucólisis hepática**.
- g) El D-Pinitol administrado en ayunas fomenta un **aumento del nivel y de la acción del glucagón**, favoreciendo la gluconeogénesis en hígado.
- h) En hígado de ratas Wistar en ayunas, tratadas con D-Pinitol (500 mg/Kg), se aprecia una inhibición de IRS-1 y Akt, así como un aumento de la actividad de GSK-3 β . Esto es indicativo de un **estado hipoactivo del receptor de la insulina en el tejido hepático**, compatible con la disminución de la secreción insulínica.

8.2. Segunda publicación. “Pharmacokinetics and endocrine effects of an oral dose of D-Pinitol in human fasting healthy volunteers”

Publicado en *Nutrients*. Octubre 2022; 14(19): 4094.

Recibido: 9 julio 2022; Aceptado: 26 septiembre 2022; Publicado: 1 octubre 2022.

Autores: **Juan A. Navarro**, Caridad Díaz, Juan Decara, Dina Medina-Vera, Antonio J. Lopez-Gamero, Juan Suarez, Francisco Javier Pavón, Antonia Serrano, Antonio Vargas, Ana Luisa Gavito, Oscar Porras-Perales, Jesús Aranda, Francisca Vicente, Carlos Sanjuan, Elena Baixeras y Fernando Rodríguez de Fonseca.

PMID: 36235746, PMCID: PMC9572189, DOI: **10.3390/nu14194094**.

Referencia bibliográfica: Navarro JA, Díaz C, Decara J, Medina-Vera D, Lopez-Gamero AJ, Suarez J, Pavón FJ, Serrano A, Vargas A, Gavito AL, et al. Pharmacokinetics and Endocrine Effects of an Oral Dose of D-Pinitol in Human Fasting Healthy Volunteers. *Nutrients*. 2022; 14(19):4094. <https://doi.org/10.3390/nu14194094>.

Resumen: El presente estudio caracteriza la farmacocinética del D-Pinitol, un inositol natural mimético de la insulina, tras su administración oral a voluntarios humanos sanos en

ayunas (14 varones y 11 mujeres). Se estudió la absorción de D-Pinitol en: a) sujetos que recibieron una dosis oral única de 15 mg/kg de D-Pinitol puro (n = 10); b) sujetos que recibieron una dosis oral única de 5 mg/kg de D-Pinitol puro (n = 6); y c) sujetos que recibieron una dosis oral única de un jarabe derivado de la vaina de la algarroba que contenía principalmente carbohidratos y un 3,2% de D Pinitol (dosis equivalente de 22,8 mg/Kg de D Pinitol, n = 9). Se recogieron muestras de sangre a los 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 y 1440 minutos después de la ingesta. Se midió la concentración plasmática de D-Pinitol y se obtuvieron sus parámetros farmacocinéticos. Los datos indican que, cuando se administra solo, la absorción de D Pinitol depende de la dosis ingerida, mostrando un T_{máx} de casi 4 h y una vida media superior a las 5 h. Cuando la fuente de D-Pinitol fue el jarabe de algarroba, la C_{máx} se redujo al 40% de la esperada en base a los datos de D-Pinitol solo, lo que sugiere una absorción reducida probablemente debido a la competencia con el transporte de monosacáridos. En este grupo, el T_{máx} se alcanzó antes que en el grupo administrado con D-Pinitol solo, pero la vida media estimada no varió. En los grupos administrados con D Pinitol puro se midieron las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina, glucagón, grelina, ácidos grasos libres y hormonas pituitarias. Se observó que una dosis de 15 mg/kg de D Pinitol no afectó a los niveles de glucosa, pero redujo las concentraciones de insulina y aumentó las de glucagón y grelina. El D-Pinitol no aumentó los niveles de otras hormonas conocidas por aumentar la glucemia, como el cortisol o la GH, los cuales, sorprendentemente, se redujeron tras la ingestión de este inositol. Otras hormonas pituitarias (gonadotropinas, prolactina y hormona estimulante de la tiroides) no se vieron afectadas tras la ingestión de D Pinitol.

En conclusión, el D-Pinitol se absorbe a través de vía oral en humanos, tiene una vida media prolongada y presenta el perfil farmacológico de un protector del páncreas endocrino, exhibiendo una actividad de potencial interés para el tratamiento o la prevención de afecciones asociadas a la resistencia a la insulina.

Abstract: The present study characterizes the oral pharmacokinetics of D-Pinitol, a natural insulin mimetic inositol, in human healthy volunteers (14 males and 11 females). D Pinitol absorption was studied in (a) subjects receiving a single oral dose of 15 mg/kg (n = 10), or (b) 5 mg/kg pure D-Pinitol (n = 6), and (c) subjects receiving D-Pinitol as part of carbohydrate containing carob pods-derived syrup with a 3.2% D-Pinitol (dose of 1600 mg/subject, n = 9). The volunteers received a randomly assigned single dose of either D-Pinitol or carob pod-derived syrup. Blood samples were collected at 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 and 1440 min after intake. Plasma concentration of D Pinitol was measured and pharmacokinetic parameters obtained. The data indicate that when given alone, the oral absorption of D-Pinitol is dose-dependent and of extended duration, with a T_{max} reached after almost 4 h, and a half-life greater than 5 h. When the source of D-Pinitol was a carob pod derived syrup, C_{max} was reduced to 40% of the expected based on the data of D-Pinitol alone, suggesting a reduced absorption probably because of competition with monosaccharide transport. In this group, T_{max} was reached before that of D-Pinitol alone, but the estimated half life remained the same. In the D-Pinitol groups, plasma concentrations of glucose, insulin, glucagon, ghrelin, free fatty acids, and pituitary hormones were additionally measured. A dose of 15 mg/kg of D-Pinitol did not affect glucose levels in healthy volunteers, but reduced insulin and increased glucagon and ghrelin concentrations. D-Pinitol did not increase other hormones known to enhance plasma glucose, such as cortisol or GH, which were surprisingly reduced after the ingestion of this inositol. Other pituitary hormones (gonadotropins, prolactin, and thyroid stimulating hormone) were not affected after D-Pinitol ingestion.

In conclusion, D-Pinitol is absorbed through the oral route, having an extended half-life and displaying the pharmacological profile of an endocrine pancreas protector, a pharmacological activity of potential interest for the treatment or prevention of insulin resistance-associated conditions.

8.2.1. Síntesis de resultados de la segunda publicación

En este artículo se da respuesta al **segundo objetivo** formulado, a saber:

Caracterizar en voluntarios humanos sanos en ayunas la farmacocinética y efectos endocrinos de la administración oral de D-Pinitol puro o como componente de un jarabe de algarroba natural.

Con este fin, se llevó a cabo la consecución de los correspondientes objetivos específicos mencionados en el apartado 6.

8.2.1.1. Análisis farmacocinético del D-Pinitol administrado a humanos sanos en ayunas, solo o como parte de un jarabe de algarroba natural

Tras la administración oral a humanos sanos en ayunas de A) una dosis de D-Pinitol de 15 mg/Kg o B) 50 g de un jarabe natural de algarroba compuesto principalmente por glucosa, fructosa y D-Pinitol (resultando en una dosis equivalente a 22,8 mg/Kg de D-Pinitol), se monitoreó la concentración plasmática de este inositol a diferentes tiempos para analizar su farmacocinética (ver diseño experimental en Figura 17).

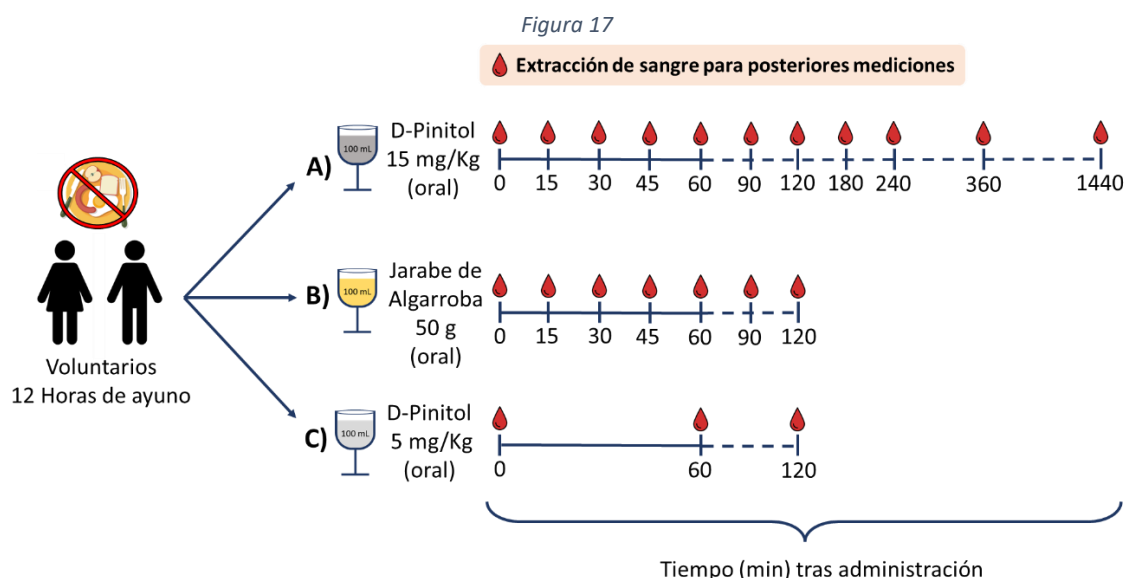


Figura 17. Esquema del diseño experimental para el análisis de la farmacocinética y los efectos endocrinos de la administración oral, en voluntarios humanos sanos en ayunas, de D-Pinitol puro (A y C) o como componente de un jarabe de algarroba natural (B).

En ambos casos (D-Pinitol 15 mg/Kg y jarabe de algarroba), el D-Pinitol fue detectado en plasma a los 30 min después de su administración; alcanzando una concentración máxima a los 240 min (T_{max}) cuando se administró en solitario, y a los 90 min (T_{max}) cuando se administró como componente del jarabe de algarroba. Las concentraciones máximas absolutas (C_{max}), así como la vida media, fueron similares en ambos casos, a pesar de las diferentes dosis administradas (Figuras 2 y 3 de Navarro JA et al., 2022, *Nutrients*). Sin embargo, calculando la relación dosis normalizada para la C_{max} , se observa una reducción de más del 40 % de la C_{max} esperada en el grupo con jarabe de algarroba; este hecho unido a la variabilidad de absorción y las diferencias en la T_{max} , sugiere **que la presencia de carbohidratos interfirió en la absorción de D-Pinitol**. El análisis de la vida media del D-Pinitol en el organismo, indica que su eliminación en humanos es mucho más lenta que en ratas.

A un tercer grupo de sujetos se les administró una concentración tres veces menor de D-Pinitol puro (5 mg/Kg) (ver Figura 17, grupo C), el objetivo era comprobar si la variación de la

dosis administrada afectaba a los niveles plasmáticos de este inositol durante la farmacocinética. Los datos al respecto mostraron a una reducción proporcional de D-Pinitol en plasma (Figura Suplementaria 1A de Navarro JA et al., 2022, *Nutrients*).

Finalmente, no hubo correlación entre la Cmax y el IMC; y el promedio de los valores máximos de D-Pinitol en plasma fueron similares entre mujeres y hombres.

8.2.1.2. Efectos del D-Pinitol sobre la glucosa plasmática y sus mecanismos de control en humanos sanos en ayunas

La administración de 15 mg/Kg de D-Pinitol a humanos sanos en ayunas (Figura 17) no alteró la glucosa plasmática, pero sí provocó una **disminución de la secreción de insulina**, reduciendo ligeramente el índice HOMA-IR, (aunque el índice HOMA- β no se vio afectado); también resultó en un **aumento del glucagón**, y en una **mayor secreción de grelina** acilada (Figura 4 de Navarro JA et al., 2022, *Nutrients*).

Por su lado, la administración de 5 mg/Kg de D-Pinitol no produjo ningún cambio significativo en los parámetros medidos (Figura Suplementaria 1B-G de Navarro JA et al., 2022, *Nutrients*), indicando ser una cantidad insuficiente para desencadenar efectos sobre estos metabolitos.

8.2.1.3. Efecto del D-Pinitol sobre hormonas pituitarias y cortisol en humanos sanos en ayunas

La grelina, producida por el estómago, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica actuando sobre circuitos neuronales centrales implicados en el control de la ingesta, el gasto energético y el metabolismo de la glucosa, entre otros. Por su parte, la glándula pituitaria, controlada por el hipotálamo, produce hormonas que regulan el crecimiento durante la infancia y la adolescencia, y hormonas que apoyan la función tiroidea y suprarrenal, que son esenciales para el metabolismo energético y la respuesta al estrés, respectivamente. Esta glándula se divide en dos partes principales: la neurohipófisis y la adenohipófisis. La adenohipófisis secreta una variedad de hormonas, incluyendo la hormona del crecimiento (GH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la prolactina (PRL), hormonas responsables de la regulación de la función sexual (hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH)), hormonas encargadas de la función suprarrenal (adrenocorticotrópica (ACTH)), entre otras. Se da la circunstancia de que la grelina estimula de forma intensa la secreción de GH, es decir, es un secretagogo de GH. El hecho de que la administración de D-Pinitol resultara en una mayor liberación de grelina, junto con los conocidos efectos de los inositoles en el eje gonadal (59,60), llevaron a examinar el efecto del D-Pinitol en los niveles circulantes de hormonas pituitarias de la adenohipófisis.

La GH es una hormona que también ejerce un gran impacto sobre los niveles de glucosa, por tanto, se examinó primero la presencia en plasma de esta hormona pituitaria tras la ingesta de D-Pinitol. Para ello se siguió el diseño experimental expuesto en la Figura 17. **Sorprendentemente**, se comprobó que la concentración plasmática de GH se vio afectada de forma negativa por la administración de 15 mg/Kg de D-Pinitol (Figura 5B de Navarro JA et al., 2022, *Nutrients*). Sin embargo, las concentraciones de otras hormonas pituitarias como la prolactina, TSH, LH o FSH no se vieron afectadas por la ingesta de este inositol (Figura 6 de Navarro JA et al., 2022, *Nutrients*).

Asimismo, se estudió el impacto del D-Pinitol en la secreción de glucocorticoides (hormonas esteroides que aumentan los niveles de glucosa); de esta manera, se midió el

cortisol plasmático, y se comprobó que una toma única de D-Pinitol 15 mg/Kg redujo la concentración en sangre de esta hormona (Figura 5A de Navarro JA et al., 2022, *Nutrients*).

8.2.2. Conclusiones de resultados de la segunda publicación

- a) El análisis farmacocinético del D-Pinitol puro administrado oralmente y de forma aguda a humanos sanos en ayunas muestra un **período prolongado de absorción**, siendo esta absorción proporcional a la dosis administrada.
- b) Cuando el D-Pinitol es administrado en una sola toma formando parte como ingrediente de un jarabe rico en carbohidratos, estos **interfieren con la absorción** del inositol.
- c) La administración oral y aguda de D-Pinitol a humanos sanos en ayunas no afectó a la glucemia, pero provocó una **disminución de la secreción de insulina** (reduciendo ligeramente el índice HOMA-IR), un **aumento del glucagón**, y una mayor secreción de grelina acilada, lo que coincide con los resultados observados en el modelo animal.
- d) En contra de lo esperado, la administración oral de D-Pinitol, de forma aguda, a humanos sanos en ayunas indujo una **disminución de los niveles plasmáticos de la hormona GH** y del cortisol.

8.3. Tercera publicación. “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”

Publicado en *Pharmaceutics*. Julio 2022; 14(8): 1594.

Recibido: 25 junio 2022; Aceptado: 28 julio 2022; Publicado: 30 julio 2022.

Autores: **Juan A. Navarro**, Juan Decara, Dina Medina-Vera, Ruben Tovar, Antonio J. Lopez-Gamero, Juan Suarez, Francisco Javier Pavón, Antonia Serrano, Marialuisa de Ceglia, Carlos Sanjuan, Yolanda Alfonso Baltasar, Elena Baixeras y Fernando Rodríguez de Fonseca.

PMID: 36015220, PMCID: PMC9416495, DOI: **10.3390/pharmaceutics14081594**.

Referencia bibliográfica: Navarro JA, Decara J, Medina-Vera D, Tovar R, Lopez-Gamero AJ, Suarez J, Pavón FJ, 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(8):1594. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081594>.

Resumen: El uso generalizado de azúcares añadidos o de edulcorantes no nutritivos en alimentos procesados supone un reto a la hora de abordar el tratamiento de la obesidad y la diabetes. Ambos tipos de edulcorantes generan problemas de salud, y a ambos se les atribuyen múltiples complicaciones asociadas a estas enfermedades prevalentes. Por ejemplo, está demostrado que el exceso de la ingesta de fructosa contribuye a la obesidad y la esteatosis hepática, mientras que los edulcorantes no nutritivos generan disbiosis intestinal que complica el control metabólico ejercido por el hígado. Ante este escenario, el presente trabajo explora un enfoque alternativo para endulzar, usando para ello un jarabe simple derivado de la algarroba. Este edulcorante consiste en una mezcla equilibrada de fructosa (47%) y glucosa (45%) como principales azúcares endulzantes, y un ingrediente natural funcional, el D-Pinitol, a una concentración (3,2%) capaz de producir efectos metabólicos

activos. La administración oral de este jarabe a voluntarios humanos sanos en ayunas (50 g), en comparación con la administración de 50 g de glucosa, provocó excursiones de glucosa menos persistentes, una menor respuesta de la insulina a la hiperglucemia producida, y un aumento en la relación glucagón/insulina. Por otro lado, la administración diaria del jarabe de algarroba a ratas Wistar durante 10 días disminuyó los depósitos de grasa en el hígado, redujo el glucógeno hepático, favoreció la oxidación de grasas y no presentó efectos tóxicos. Además, esta administración repetida del jarabe mejoró la respuesta de la glucemia tras una carga de glucosa exógena de 2 g/Kg. En conjunto, los datos muestran que el jarabe de algarroba, al tiempo que conserva la palatabilidad natural de un jarabe de glucosa/fructosa, también presenta efectos metabólicos beneficiosos que podrían servir para proteger de una progresión hacia la obesidad, así como del desarrollo de esteatosis hepática.

Abstract: The widespread use of added sugars or non-nutritive sweeteners in processed foods is a challenge for addressing the therapeutics of obesity and diabetes. Both types of sweeteners generate health problems, and both are being blamed for multiple complications associated with these prevalent diseases. As an example, fructose is proven to contribute to obesity and liver steatosis, while non-nutritive sweeteners generate gut dysbiosis that complicates the metabolic control exerted by the liver. The present work explores an alternative approach for sweetening through the use of a simple carob-pod-derived syrup. This sweetener consists of a balanced mixture of fructose (47%) and glucose (45%), as sweetening sugars, and a functional natural ingredient (D-Pinitol) at a concentration (3.2%) capable of producing active metabolic effects. The administration of this syrup to healthy volunteers (50 g) resulted in less persistent glucose excursions, a lower insulin response to the hyperglycemia produced by its ingestion, and an enhanced glucagon/ insulin ratio, compared to that observed after the ingestion of 50 g of glucose. Daily administration of the syrup to Wistar rats for 10 days lowered fat depots in the liver, reduced liver glycogen, promoted fat oxidation, and was devoid of toxic effects. In addition, this repeated administration of the syrup improved glucose handling after a glucose (2 g/kg) load. Overall, this alternative functional sweetener retains the natural palatability of a glucose/fructose syrup while displaying beneficial metabolic effects that might serve to protect against the progression towards complicated obesity, especially the development of liver steatosis.

8.3.1. Síntesis de resultados de la tercera publicación

A través de esta investigación se pretendió comprobar la idoneidad de la hipótesis secundaria planteada, referente a la posibilidad de usar el jarabe de algarroba (que contiene 45,6% glucosa, 47,3% fructosa, 0,5% sacarosa y 3,2% de Pinitol) como un producto natural con un gran poder endulzante a la vez que podría presentar la ventaja de exhibir un bajo índice glucémico, debido a la presencia de D-Pinitol en su composición. El interés en analizar los efectos del jarabe de algarroba es además comercial, dado que la obtención de esta sustancia resulta menos costosa y laboriosa que la obtención de D-Pinitol puro.

Este estudio se divide en dos partes. En la primera, usando un modelo humano, se da respuesta al **tercer objetivo** planteado, a saber:

Evaluar los efectos de la administración oral de jarabe de algarroba sobre aspectos que controlan y se relacionan con la función metabólica de la insulina, para su consideración como endulzante natural en humanos obesos y/o diabéticos.

En la segunda parte de este estudio, empleando un modelo de ratas Wistar, se da respuesta al **cuarto y quinto objetivos** propuestos, a saber:

Evaluar los efectos de la administración crónica de jarabe de algarroba (administrado en el agua de la bebida) sobre aspectos que controlan y se relacionan con la función

metabólica de la insulina en plasma y tejido hepático de ratas Wistar, mantenidas bajo una dieta normal.

Evaluar los efectos de la administración crónica de jarabe de algarroba (administrado en el agua de la bebida) sobre aspectos que controlan y se relacionan con la función de la insulina en hipotálamo e hipocampo de ratas Wistar, mantenidas bajo una dieta normal.

Con estos propósitos, se llevó a cabo la consecución de los correspondientes objetivos específicos mencionados en el apartado 6.

Primera parte. Estudios en humanos respecto a la ingesta aguda de jarabe de algarroba:

8.3.1.1. Impacto de la ingesta aguda de jarabe de algarroba sobre la glucemia en humanos sanos en ayunas y cálculo de su índice glucémico

Usando el diseño experimental que se muestra en la Figura 18, voluntarios humanos sanos en ayunas fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos:

- A) Solución de agua con 50 g de glucosa pura.
- B) Solución de agua con 50 g de jarabe de algarroba. Estos 50 g incluyen, además de fructosa y glucosa, una cantidad de 1600 mg de D-Pinitol, de manera que se ajustaría a una dosis de 22,8 mg D-Pinitol/Kg de peso corporal en una persona de 70 Kg. Esta dosis es una extrapolación a humanos de las dosis usadas en modelos animales, y se calcula a partir de la diferente tasa metabólica de los roedores.
- C) Solución de agua con 50 g de jarabe de agave comercial (con un contenido del 70% fructosa y 25% glucosa).

Figura 18

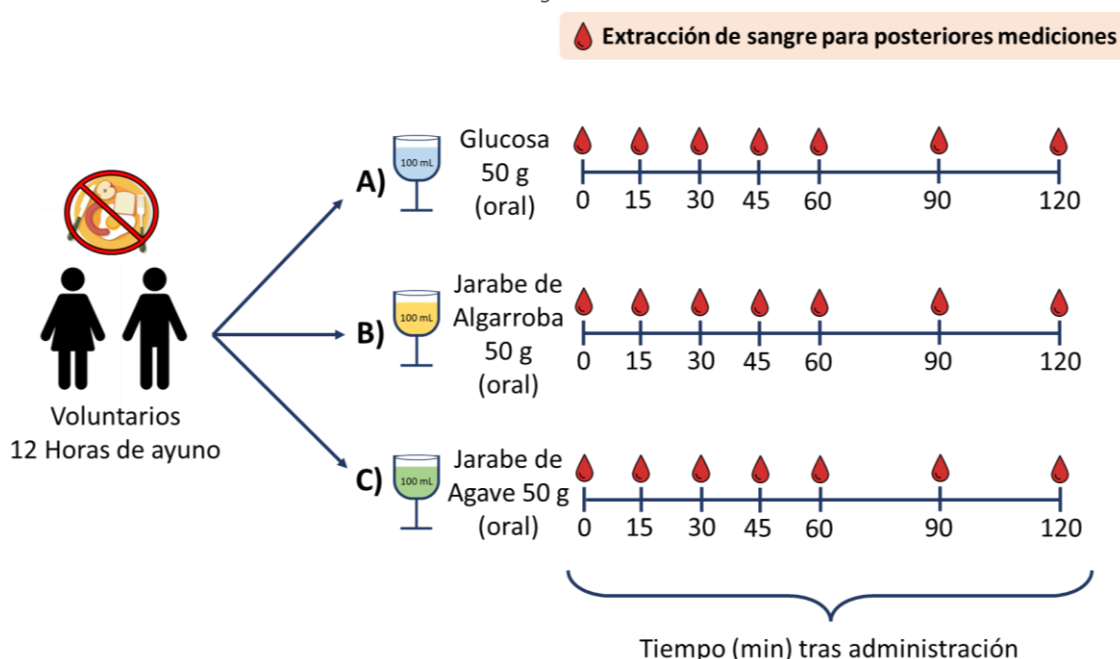


Figura 18. Esquema del diseño experimental para analizar los efectos metabólicos y endocrinos de la administración oral de jarabe de algarroba en voluntarios humanos sanos en ayunas, comparándolos con los producidos por la administración de glucosa o de jarabe de agave comercial.

La administración de 50 g de jarabe de algarroba generó un rápido aumento de la glucemia, alcanzando su punto máximo a los 30 min después de la ingesta, de forma similar a la administración de 50 g de glucosa; pero a diferencia de este grupo, el jarabe de algarroba

consiguió recuperar los niveles de glucosa en plasma mucho más rápidamente, volviendo a la normoglucemia en la primera hora después de la administración. Por su parte, la ingesta de jarabe de agave produjo un menor aumento de la glucemia que el jarabe de algarroba y que la glucosa sola, debido a que predomina la fructosa en su composición. Sin embargo, a diferencia del jarabe de algarroba, el aumento de la glucemia permaneció estable y sin llegar a recuperar los índices normales durante los 120 min que duró el estudio (Figura 1B de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

El análisis comparativo del área bajo la curva (AUC) confirmó que los individuos que tomaron glucosa permanecían más tiempo en estado de hiperglucemia en comparación con los que tomaron jarabe de algarroba o jarabe de agave. Curiosamente, a pesar de un mayor pico de glucosa observado a los 30 min tras la toma de jarabe de algarroba, se encontró que el AUC de ambos jarabes (algarroba y agave) eran muy parecidos, debido a que con jarabe de algarroba se alcanzaba los niveles de normoglucemia basales de forma más rápida (Figura 1B de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*). Esto se confirmó analizando el % de cambio sobre los valores de glucosa basal, un mejor índice para la respuesta fisiológica a las excursiones de glucosa; de nuevo, el AUC reveló que los sujetos que recibían glucosa tenían variaciones más duraderas de la glucemia, siendo el jarabe de algarroba el edulcorante más eficaz a la hora de volver a los niveles basales de glucemia (Figura 1C de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

Por otro lado, se normalizó a 100 el AUC del grupo administrado con glucosa, y se usó para calcular el **índice glucémico** de los jarabes de algarroba y agave. Resultó de interés que el jarabe de algarroba presentó un índice glucémico de $73,4 \pm 6,9$, mientras que el del jarabe de agave fue algo más alto, de $76,2 \pm 3,3$. Estos resultados indican que, a pesar de tener el doble de glucosa en comparación con el jarabe de agave, la presencia de D-Pinitol en el jarabe de algarroba ayuda a retirar rápidamente el exceso de glucosa circulante generado tras su ingesta, lo que se traduce en un índice glucémico muy parecido entre ambos jarabes.

En cuanto a los niveles de fructosa plasmática, como era de esperar, el jarabe de agave generó un aumento mayor y más prolongado en el tiempo que el jarabe de algarroba (Figura 1E de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

8.3.1.2. Impacto de la ingesta aguda de jarabe de algarroba sobre niveles séricos de insulina y glucagón en humanos sanos en ayunas

Siguiendo la pauta de tratamiento presentada en la Figura 18, se observó, como era de esperar, que las excursiones de glucosa causaron un incremento rápido en los niveles de **insulina** en plasma en los sujetos que recibieron glucosa o jarabe de algarroba, pero no en los que recibieron jarabe de agave (basado en fructosa) (Figura 1D de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*). El análisis del AUC reveló que el incremento en los niveles de insulina fue más breve y menos intenso en los sujetos que recibieron jarabe de algarroba respecto al grupo que recibió glucosa; esto se ve reflejado en el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR), que presentó un mejor perfil en el grupo administrado con jarabe de algarroba comparado con el grupo al que se le administró solo glucosa. El grupo que recibió jarabe de agave apenas presentó variaciones en las concentraciones plasmáticas de insulina, por lo que tampoco se detectaron variaciones en el índice HOMA-IR (datos no mostrados en publicación).

Respecto a los niveles sanguíneos de **glucagón**, los tres grupos presentaron un perfil similar (Figura 1F de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*). No obstante, la ratio glucagón/insulina fue mayor en el grupo con jarabe de algarroba respecto al grupo con glucosa, poniendo en relieve una menor necesidad de insulina, lo que permite un papel más activo del glucagón en los individuos tratados con jarabe de algarroba (Figura Suplementaria 1 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

8.3.1.3. Impacto de la ingesta aguda de jarabe de algarroba sobre niveles séricos de grelina y de otras hormonas pituitarias en humanos sanos en ayunas

La concentración de **grelina** en plasma no se vio afectada de manera significativa, ni por la administración de glucosa, ni por la de jarabe de algarroba (Figura 1G de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

Respecto a los niveles plasmáticos de las hormonas pituitarias analizadas (PRL, TSH, LH y FSH), se comprobó que estos no se vieron afectados por una única toma de jarabe de algarroba (Figura Suplementaria 3 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

8.3.1.4. Impacto de la ingesta aguda de jarabe de algarroba, en humanos sanos en ayunas, sobre las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres, β -hidroxibutirato y cetonas

En el plasma de individuos que siguieron el diseño experimental que se muestra en la Figura 18, se midieron algunos metabolitos de interés: ácidos grasos libres ("*Free Fatty Acids*", FFA) y productos de su catabolismo, como β -hidroxibutirato y cetonas.

La lipólisis y el aumento de FFA es un proceso que se produce durante el estado de ayunas. Como era de esperar, la concentración plasmática de FFA disminuyó en sujetos que recibieron glucosa, efecto que apareció 45 min después de la ingesta de este monosacárido, y que se prolongó hasta los 120 min. Esto es un fenómeno relacionado con el aumento de insulina tras la ingesta, que inhibe la lipólisis en tejido adiposo y fomenta la lipogénesis en los tejidos adiposo y hepático. Este resultado no se observó en los individuos que recibieron jarabe de algarroba, donde las concentraciones plasmáticas de FFA se mantuvieron estables (Figura 1H de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

También se descubrió que los niveles en plasma de β -hidroxibutirato disminuyeron por igual en los individuos tratados con glucosa y con jarabe de algarroba, sin existir diferencias entre ambos tratamientos (Figura Suplementaria 2 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*). Además, los sujetos de estudio no presentaron niveles elevados de cetonas en plasma a pesar de estar en ayunas, y ni la administración de glucosa ni la de jarabe de algarroba hicieron variar estos niveles (Figura Suplementaria 2 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

En conjunto, estos resultados indican que un posible efecto antilipogénico del jarabe de algarroba no derivó en la creación de cuerpos cetónicos como proveedores de glucosa.

Segunda parte. Estudios en un modelo de rata Wistar respecto a la ingesta aguda y crónica de jarabe de algarroba:

8.3.1.5. Efectos de la ingesta de jarabe de algarroba, tras administración aguda en ayunas, sobre la glucemia en un modelo de rata Wistar

Para comprobar si la presencia de D-Pinitol en el jarabe de algarroba afecta a la glucemia de una manera diferente a la observada cuando se administra solo glucosa, se desarrolló un breve estudio en el que a un grupo de animales se les administró de forma oral una dosis de jarabe de algarroba que contuviera la misma cantidad de glucosa que otro grupo que solo recibió la glucosa (Figura 19). La administración de esta dosis de jarabe de algarroba (con un contenido de 2 g/Kg de glucosa, 2,1 g/Kg de fructosa y 130 mg/Kg de D-Pinitol) resultó en una hiperglucemia menos intensa que en los animales que recibieron la misma cantidad de glucosa en solitario (2 g/Kg), esto fue confirmado por el análisis del área bajo la curva, que reveló que el tiempo bajo condiciones de hiperglucemia **fue menor** en los animales que

tomaron el jarabe (Figura 2A de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*). Estos resultados son similares a los observados en humanos.

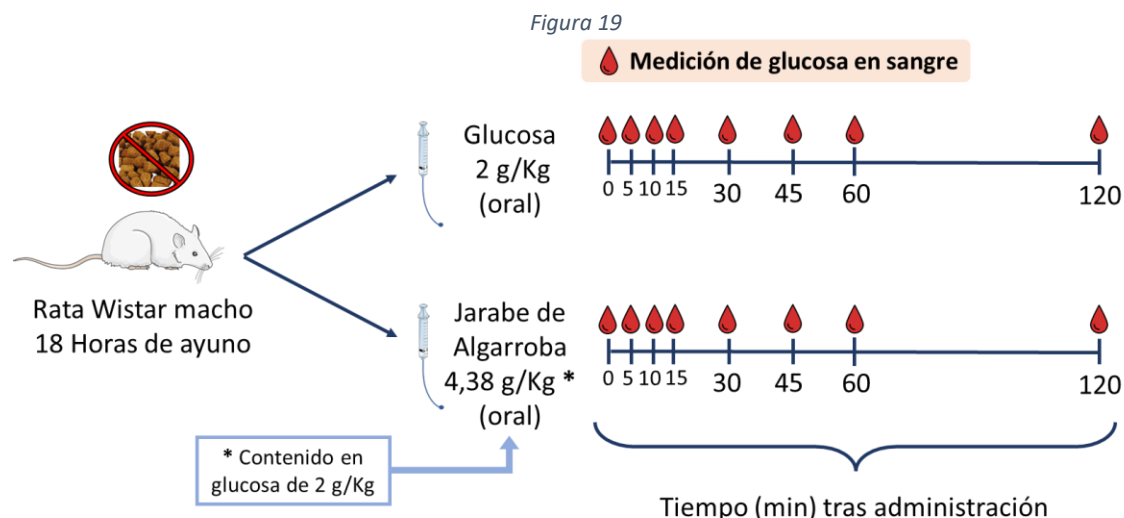


Figura 19. Esquema del diseño experimental para el análisis de los efectos de una administración aguda de jarabe de algarroba sobre la glucemia de ratas Wistar macho en ayunas. Partes de la figura se diseñaron utilizando imágenes de Servier Medical Art. Servier Medical Art de Servier está licenciado bajo Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

8.3.1.6. Efectos del jarabe de algarroba sobre la glucemia tras administración crónica (oral, disuelto en la bebida) en un modelo de rata Wistar

A continuación, se estudió si la administración repetida de jarabe de algarroba (durante 10 días, a una dosis que contuviera **100 mg/Kg/día de D-Pinitol**) era suficiente para mejorar la gestión de la glucosa tras una carga oral de 2 g/Kg de este monosacárido. Para ello se realizó un test de tolerancia a glucosa (GTT) el **día 8** del estudio (diseño experimental en Figura 20). Se observó como la ingesta del jarabe de algarroba redujo la intensidad de la hiperglucemia que se produce tras la carga de glucosa exógena, en comparación con los animales que solo tomaron agua durante los 8 días de tratamiento (Figura 2B de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*). Una vez más, el análisis del área bajo la curva mostró que la duración del tiempo bajo condiciones de hiperglucemia en animales que tomaron jarabe de algarroba fue menor que el observado en animales que bebieron solo agua.

Figura 20

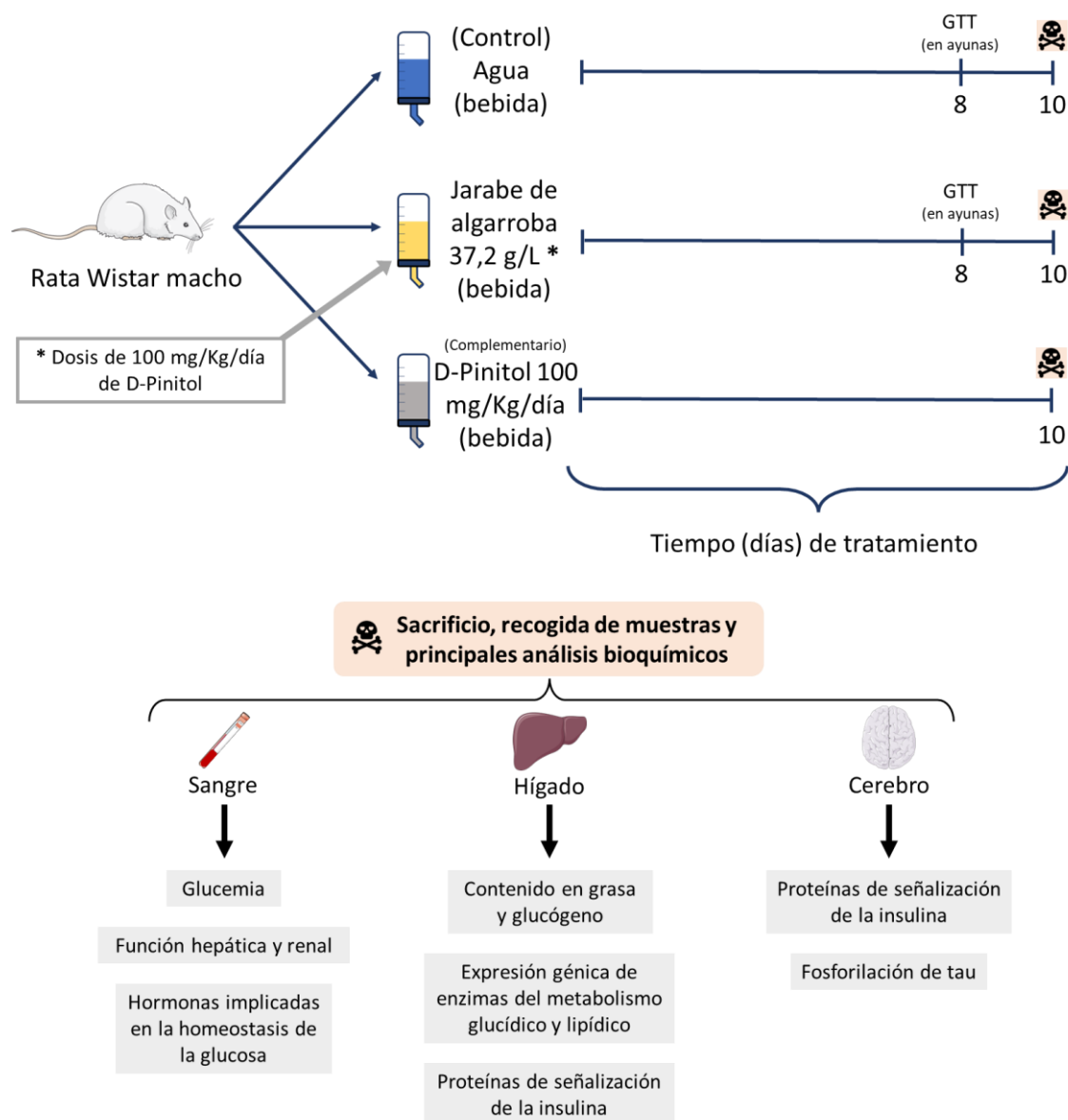


Figura 20. Esquema del diseño experimental para el análisis de los efectos de una administración repetida (10 días) de jarabe de algarroba o D-Pinitol puro (estudio complementario), disueltos en la bebida, sobre diferentes parámetros biológicos de ratas Wistar macho, siendo sometidas a un GTT el día 8 de tratamiento.

8.3.1.7. Efectos de la administración crónica de jarabe de algarroba y de D-Pinitol puro (oral, disueltos en la bebida) sobre parámetros bioquímicos en plasma e hígado de ratas Wistar

Para verificar si el consumo crónico de jarabe de algarroba produce alteraciones en la bioquímica tanto del plasma como del hígado, se sometió a los animales a 10 días de tratamiento con este endulzante disuelto en la bebida (Figura 20), tras lo cual se realizaron varios controles analíticos.

La ingesta de jarabe de algarroba no alteró los principales indicadores de la función hepática y renal, ya que los animales presentaban niveles plasmáticos normales de AST, ácido úrico, bilirrubina, creatinina o de malondialdehído (MDA, metabolito indicador de estrés oxidativo). Solo aumentó la concentración de urea en plasma, lo que sugiere una mayor

producción de urea por parte del hígado, probablemente derivada de las acciones descritas del D-Pinitol como promotor del efecto del glucagón, y no derivada de las funciones renales, ya que se mantuvo la eliminación de creatinina (Tabla 3 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

Los niveles plasmáticos de insulina, glucagón o leptina, hormonas implicadas en la homeostasis de la glucosa y el apetito, no se vieron afectados por el consumo de jarabe de algarroba. Sin embargo, la concentración de grelina (hormona cuyos niveles plasmáticos ya se comprobó que aumentaban tras la administración aguda de D-Pinitol), fue más alta en los animales que recibieron jarabe de algarroba a través de la bebida (Tabla 3 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

Por otro lado, el **contenido de grasa en el hígado disminuyó significativamente** después del consumo de jarabe de algarroba, este efecto no estuvo relacionado ni con la producción de triglicéridos ni con la de β -hidroxibutirato, cuyos niveles no se vieron afectados por el consumo de este jarabe. Finalmente, también se halló que el contenido de glucógeno hepático se redujo en los animales que consumieron jarabe de algarroba (Tabla 3 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

En lo referente al estudio complementario, en el que se administró a los animales una dosis de 100 mg/kg/día de D-Pinitol puro a través de la bebida durante 10 días (Figura 20), solo se observó un efecto sobre la producción de urea y sobre el contenido de grasa del hígado, siendo este igual al producido por la administración de jarabe de algarroba (Tabla Suplementaria 2 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

8.3.1.8. Impacto de la administración crónica de jarabe de algarroba sobre la expresión génica de enzimas clave para las vías del metabolismo glucídico y lipídico en el hígado de ratas Wistar

Tras 10 días de tratamiento con jarabe de algarroba disuelto en la bebida (Figura 20), se examinó, mediante PCR en tiempo real, la expresión génica de enzimas clave en gluconeogénesis (*Pc*, *Fbp1*, *Pck1*, y *G6pc*), glucólisis (*Pklr*), síntesis de *nov*o de lípidos (*Fasn*, *Acaca* y *Scd1*), β -oxidación de ácidos grasos (*Acox1* y *Cpt1a*), además de la isoforma 1 de la subunidad IV de la cadena respiratoria mitocondrial (*Cox4i1*); todas presentes en el hígado de ratas Wistar.

Se comprobó que el consumo de jarabe de algarroba **aumentó significativamente la expresión** de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (*Pck1*) y de la glucosa-6-fosfatasa subunidad catalítica (*G6pc*), lo que sugiere un refuerzo en la actividad de la vía **gluconeogénica** (Figura 3 publicación de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*). Curiosamente, también se observó un aumento en la expresión de la enzima glucolítica piruvato quinasa (*Pklr*), cuya expresión génica aumenta bajo el estímulo de ingesta de glucosa.

El análisis de la expresión génica de enzimas que promueven la síntesis de *nov*o de lípidos, mostró que el consumo de jarabe de algarroba no afectada a dicha expresión. Sin embargo, tras la administración de este jarabe natural, se detectó un claro aumento en la expresión génica de enzimas mitocondriales relacionadas con la β -oxidación de ácidos grasos (acil-coenzima A oxidasa 1, *Acox1*; y carnitina palmitoiltransferasa 1a, *Cpt1a*), así como de la isoforma 1 de la subunidad IV de la citocromo c oxidasa (*Cox4i1*) (Figura 4 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*), mostrando que el jarabe de algarroba favorece la vía de la β -oxidación de grasas y de la cadena respiratoria en la mitocondria hepática. Estos datos son compatibles con la disminución en el contenido de grasa del hígado que se describe en el apartado anterior, y que se reproduce tras el tratamiento crónico tanto con jarabe de algarroba como con D-Pinitol puro (Tabla 3 y Tabla Suplementaria 2 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

8.3.1.9. Efectos de la administración crónica de jarabe de algarroba sobre proteínas clave en la señalización de la insulina en hígado, hipocampo e hipotálamo de ratas Wistar

Siguiendo el diseño experimental expuesto en la Figura 20, tras 10 días de tratamiento con jarabe de algarroba disuelto en la bebida, se estudió el estado de proteínas clave en la señalización del receptor de la insulina en hígado y cerebro mediante un análisis por Western blot.

En hígado, la ingesta crónica de jarabe de algarroba no afectó al estado de fosforilación de las enzimas Akt, GS o mTOR, por lo tanto, no se observó un incremento de la activación de la vía canónica de señalización de la insulina hepática (Figura 5 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*). Sin embargo, el tratamiento sí aumentó de forma significativa la fosforilación inhibitoria de la proteína GSK-3 en sus isoformas α y β . Dado que la actividad de Akt no parecía estar afectada por la ingesta de jarabe de algarroba, se descartó que la inhibición de GSK-3 pudiera estar incentivada por la vía canónica de la insulina.

Este último resultado nos llevó a analizar el efecto del tratamiento con jarabe de algarroba en áreas del cerebro insulino-sensibles, como el hipotálamo y el hipocampo; precisamente áreas en las que la fosforilación de la proteína tau es dependiente, en parte, de la quinasa GSK-3 y siendo esta a su vez regulada negativamente a través de la vía canónica de la insulina (PI3K/Akt/GSK-3).

El estudio en **hipotálamo** mostró que la administración del jarabe causó un aumento significativo de la fosforilación activadora de mTOR, así como una tendencia (aunque no estadísticamente significativa) a aumentar la fosforilación activadora de Akt; aun así, el jarabe no fue capaz de bloquear la fosforilación inhibitoria de GS, indicando que la vía Akt/GS no resultó del todo activada (Figura Suplementaria 5 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*).

En **hipocampo** no se hallaron efectos claros del jarabe de algarroba sobre la ruta de señalización de la insulina. Sin embargo, se observaron dos hechos que podrían estar relacionados. Por un lado, si bien la fosforilación inhibitoria de GSK-3 en residuos de Ser no aumentó, sí se detectó una disminución de la fosforilación en residuos de Tyr, la cual se relaciona con la estabilidad y máxima actividad de la enzima. Por tanto, se podría deducir de esta última observación que la actividad la GSK-3, al menos, resulta disminuida bajo el tratamiento crónico con el jarabe de algarroba. Por otro lado, en hipocampo también se observó una clara disminución de la fosforilación de la **proteína tau** (Figura 6 de Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*), un sustrato tanto de la enzima GSK-3 como de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) (66), y cuya hiperfosforilación se relaciona con enfermedades neurodegenerativas. Estos resultados indican que el efecto del jarabe de algarroba llega al cerebro, haciendo necesaria investigación adicional.

8.3.2. Conclusiones de resultados de la tercera publicación

Primera parte. Concerniente a estudio en humanos:

- a) Una toma única de jarabe de algarroba en humanos sanos en ayunas produce un **menor aumento de la glucemia** en comparación con la administración de glucosa sola o de jarabe de agave, presentando además un **menor índice glucémico** y postulándose como un edulcorante eficaz a la hora de restaurar rápidamente las condiciones de normoglucemia.
- b) Una toma única de jarabe de algarroba en humanos sanos en ayunas produce un incremento de **insulina** circulante **menos intenso y más breve** que en sujetos que

reciben glucosa en solitario; además la ratio glucagón/insulina fue mayor en los sujetos que tomaron jarabe de algarroba.

- c) La concentración de **grelina** en plasma de humanos sanos en ayunas **no se vio afectada** tras una toma única de jarabe de algarroba, al contrario de lo observado en trabajos anteriores con el tratamiento agudo con D-Pinitol solo, por lo que la presencia de glucosa en el jarabe puede representar una ventaja al respecto.
- d) La concentración plasmática de **ácidos grasos libres no se vio afectada** en humanos sanos en ayunas que recibieron una administración aguda de jarabe de algarroba respecto a los que tomaron glucosa sola, lo que se sugiere que el jarabe no fomenta la inhibición de lipólisis ni aumenta la lipogénesis, como sí hace la glucosa.

Segunda parte. Concerniente a estudio en el modelo de rata Wistar:

- a) La administración aguda de jarabe de algarroba a ratas Wistar en ayunas, en una proporción que contuviera 2 g/Kg de glucosa, resultó en una **hiperglucemia menos intensa** que en los animales que recibieron la misma cantidad de glucosa en solitario.
- b) La administración crónica de jarabe de algarroba a ratas Wistar predispone a una **mejor tolerancia a la glucosa**.
- c) La administración crónica de jarabe de algarroba a ratas Wistar **no mostró signos de toxicidad hepática o renal**, ni afectó a los niveles plasmáticos de insulina, glucagón o leptina; pero sí aumentó los niveles plasmáticos de grelina.
- d) La administración crónica de jarabe de algarroba a ratas Wistar **disminuyó el contenido de grasa en el hígado**, lo que es compatible con un **aumento de la expresión génica de enzimas relacionadas con la β -oxidación de ácidos grasos** en este órgano.
- e) La administración crónica de jarabe de algarroba a ratas Wistar **disminuyó el contenido de glucógeno en el hígado**, lo que es compatible con un **aumento de la expresión génica de enzimas gluconeogénicas** y con la ausencia de activación de la vía de síntesis de glucógeno hepático.
- f) La administración crónica de jarabe de algarroba a ratas Wistar **no mostró ejercer un efecto activador** sobre componentes de la vía canónica de señalización del receptor de la insulina en tejido hepático.
- g) La administración crónica de jarabe de algarroba a ratas Wistar induce en **hipotálamo una fosforilación activadora de mTOR**, así como una tendencia (no significativa) a activar Akt e inhibir GSK-3 β , lo que sugiere que en este tejido el jarabe de algarroba podría comportarse como un insulino-mimético.
- h) La administración crónica de jarabe de algarroba a ratas Wistar induce en **hipocampo una clara disminución de la fosforilación de la proteína tau**. Este hecho puede tener una repercusión interesante en taupatías que cursan con deterioro cognitivo.



9. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en el apartado anterior se discuten a continuación en tres secciones correspondientes a los tres estudios publicados.

9.1. Estudio 1. Efectos de la administración oral aguda de D-Pinitol en un modelo de rata Wistar en ayunas (publicado en Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*)

En el primer estudio se proporciona una nueva perspectiva sobre la absorción oral y los efectos metabólicos del D-Pinitol en un modelo de rata Wistar en condiciones de ayuno, cuando se espera que la concentración de glucosa circulante se encuentre a niveles basales. El análisis farmacocinético mostró que tras la ingesta de D-Pinitol, este se absorbe fácilmente y se detecta rápidamente en plasma y en hígado, alcanzando un pico máximo de concentración plasmática a los 60 min tras su ingesta, y sufriendo a partir de ahí una rápida eliminación, prácticamente desapareciendo 6 horas después de su administración. Asimismo, la farmacocinética hepática indica un aumento de la concentración de este inositol en el hígado, alcanzando su pico máximo a los 120 min tras la ingesta, es decir 1 hora más tarde que en plasma, pero presentando una tasa de eliminación similar. Así, la vida media del D-Pinitol en plasma fue de 108 min y en hígado de 154 min. Esta farmacocinética es paralela a los efectos transitorios observados en diferentes aspectos metabólicos aquí estudiados y que se discutirán más adelante. Además, como se verá en el siguiente estudio, la vida media del D-Pinitol sigue la tasa metabólica comparativa entre roedores y humanos, siendo en los roedores sensiblemente mas corta.

Una conclusión importante que se puede inferir de estos hallazgos es que, si bien existe la posibilidad de que el D-Pinitol sufra la conversión a D-Chiro-inositol en un entorno ácido como el del estómago, la cantidad de D-Pinitol que, según nuestro estudio, se detecta en el torrente sanguíneo y en el hígado, apoya que el D-Pinitol como tal pueda actuar como un producto nutricional activo con efectos endocrinos directos. Las concentraciones máximas de D-Pinitol que se alcanzan en plasma están en torno a 30 μM , y en hígado en torno a 15 μM , siendo un rango de concentraciones farmacológicamente razonables.

El análisis de biomarcadores plasmáticos indicativos de disfunción renal o hepática reveló que las **dosis de 100 y 500 mg/Kg de D-Pinitol no resultaron tóxicas**. Cabe señalar que cuando se administró una dosis alta (500 mg/Kg), los niveles de la transaminasa AST/GOT se redujeron transitoriamente a los 120 min, mientras que los de ALT/GPT (más específica de lesión hepática) aumentaron significativamente a los 240 min. Respecto a este último dato, se pudo comprobar más tarde que la administración repetida, durante 9 semanas, de D-Pinitol (100 y 500 mg/Kg) no afectó al perfil de transaminasas (estudio en progreso). Por tanto, el análisis global de estos resultados permitió concluir que el D-Pinitol puede considerarse seguro para el hígado y el riñón tras una sola administración oral en las cantidades antes mencionadas.

En este punto, hay que remarcar que el efecto más impactante de la administración aguda de D-Pinitol (100 y 500 mg/Kg) que se observó en el modelo de rata Wistar, fue la **reducción significativa de los niveles de insulina circulante**, de hasta un 50 % durante más de 4 h, con el resultado neto de un **ahorro importante de insulina** a la vez que se producía un **incremento en los niveles de glucagón**, lo que conllevó un aumento de la **ratio glucagón/insulina**. En este aspecto, conviene destacar de nuevo que nuestros experimentos *in vivo* se llevaron a cabo en condiciones de **ayuno**; en estas condiciones se supone que el glucagón desempeña un papel crucial en la recuperación constante de los niveles basales de glucosa en sangre, promoviendo para ello la gluconeogénesis y la glucogenólisis en el hígado.

Por tanto, una ratio elevada de glucagón/insulina después de la ingesta de D-Pinitol podría explicarse por una hipoglucemia inicial con tendencia a prolongarse. Esta posibilidad que se plantea se basa en las propiedades insulino-miméticas que se le atribuyen al D-Pinitol en el músculo esquelético, donde promueve la translocación de GLUT4 a membrana (52), facilitando la captación de glucosa circulante y rebajando la hiperglucemia posprandial. Esta propiedad del D-Pinitol se ha comprobado en modelos animales afectados por diabetes (45,53,517,518), así como en pacientes humanos diabéticos (481,519), o en estudios realizados después de la ingesta oral de alimentos o de glucosa (52). Por tanto, sería concebible que, en las condiciones de ayuno, el D-Pinitol promoviera una hipoglucemia transitoria en los primeros minutos debido a su acción sobre el músculo, un efecto que no se ha detectado en este estudio porque las medidas de parámetros metabólicos y bioquímicos se empezaron a evaluar a los 60 min después de la ingesta, un tiempo suficiente para que se pusiese en marcha la maquinaria hepática de la glucogenólisis y gluconeogénesis mediadas por el glucagón, para así equilibrar la concentración de glucosa sanguínea lo que se manifiesta como una normoglucemia. De hecho, es muy plausible que la bajada de niveles de insulina que se detecta en el modelo animal a partir de los 60 min tras una única toma oral de D-Pinitol, y que permanece a lo largo del tiempo de ensayo hasta los 240 min, se vea favorecida por esa posible hipoglucemia inicial, un efecto que se vería compensado por la subida de glucagón en plasma. En estas circunstancias, por tanto, resulta coherente que la ratio de glucagón/insulina tras la ingesta de D-Pinitol fuera elevada. Una **disminución del índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR)** podría ser reflejo de estos hechos que se describen, lo que redundaría en una mejora de la sensibilidad a esta hormona, es decir, en **presencia de D-Pinitol se requeriría de menos insulina**.

Estos resultados sobre el control de la glucemia por parte del D-Pinitol, junto con los datos sobre su farmacocinética, permiten plantear la idoneidad de una posible administración repetida (por ejemplo, dos o tres veces al día), en el caso de que este compuesto pudiera ser utilizado como protector pancreático endocrino y/o como corrector de la glucemia. En este sentido, estudios realizados en pacientes con T2DM que tomaron D-Pinitol tres veces al día y de forma crónica, también mostraron una reducción del índice HOMA-IR, pero en esta ocasión el D-Pinitol redujo los niveles de glucosa plasmática en ayunas y no parecía ejercer efecto alguno sobre los niveles de insulina o de péptido C circulantes (519); estas diferencias con respecto a nuestro estudio posiblemente se deban al estado diabético de los pacientes.

El aumento de la actividad del glucagón estimula en el hígado la gluconeogénesis y la glucogenólisis a través de la activación de la vía AMPc/proteína quinasa A (PKA). La activación de PKA fosforila el factor CREB (520), que entre sus genes diana presenta a *Fbp1*, *Pck1* o *G6pc*, cuyos productos proteicos son enzimas implicadas en la gluconeogénesis. En nuestros experimentos *in vivo* no se observaron cambios en la transcripción de estos genes hepáticos después de la administración aguda de D-Pinitol, lo que sugiere que la vía gluconeogénica no estaba afectada a nivel de transcripción de estos genes. En cambio, las ratas que tomaron D-Pinitol presentaron una menor expresión del gen *Pklr*, cuyo producto proteico es la enzima piruvato quinasa, L-PK. Esta enzima es crucial en el control de la tasa glucolítica, y se sabe que el glucagón inhibe tanto la actividad de la L-PK hepática (estimulando su fosforilación a través de la PKA) como la transcripción de su gen *Pklr* (521,522). Por el contrario, la insulina activa la L-PK, estimulando su desfosforilación (523–525). En este contexto, los resultados presentes indican que el D-Pinitol conduciría a la reducción de la ruta glucolítica en el hígado a través de la disminución de la expresión de *Pklr*, como consecuencia de un aumento de la ratio glucagón/insulina. Asimismo, la atenuación en la fosforilación de la proteína Akt hepática que se observó tras la toma de D-Pinitol, apunta a una menor acción de la insulina en hígado, lo que también es compatible con una fase de ayuno y con los bajos niveles de insulina detectados en plasma tras la toma aguda de D-Pinitol. Un detalle relevante a tener en cuenta, es que **los resultados indican que el D-Pinitol por sí mismo no solo no es capaz de activar la**

vía PI3K/Akt en el hígado en ayunas, sino que, además, no bloquea la vía de señalización del glucagón como sí lo hace la vía canónica de señalización de la insulina en este órgano. En este sentido, tal y como se mencionó en la introducción de esta tesis, cabe recordar que la vía insulínica PI3K/Akt activa la fosfodiesterasa PDE3B que degradaría el AMPc en hígado, antagonizando así con la señalización y efectos del glucagón. Obviamente, esta actuación se produce tras la ingesta, que es cuando aumentarían los niveles de insulina. Lo que es interesante de nuestro estudio es que demuestra que el D-Pinitol por sí solo, en ayunas, no es capaz de emular este efecto insulínico en el hígado. Otros trabajos, sin embargo, muestran que el D-Pinitol sí que puede activar la vía de la PI3K/Akt en el hígado mejorando la sensibilidad a insulina, pero cabe señalar que este efecto se muestra en un modelo de diabetes con una hiperglucemia manifiesta, en presencia de insulina y con un tratamiento crónico de D-Pinitol (Gao Y et al., 2015 (53)).

En el presente estudio también se demuestra que la administración aguda de D-Pinitol no afectó a los niveles de ciertas hormonas que controlan la acción de la insulina y el balance energético, como son IGF-1, adiponectina o leptina. Se trata de un conjunto muy limitado de hormonas reguladoras, y no se obtuvieron datos de los niveles de otros metabolitos que también modulan la dinámica de la insulina, mediadores importantes que no pudieron monitorizarse, como GLP-1 o resistina. Sin embargo, aquí se muestra por primera vez los efectos contundentes de la toma de una única dosis de D-Pinitol en ayunas sobre los niveles de **grelina**, produciendo un aumento de estos y resultando un **efecto específico del D-Pinitol** para esta hormona. Una consecuencia importante de este aumento de grelina serían sus efectos centrales, especialmente los procognitivos (526), aunque no se abordaron en este estudio. También se sabe que la grelina inhibe la secreción de insulina en las células pancreáticas (54,55), lo que sugiere que el D-Pinitol pueda ejercer un efecto inhibitorio de la secreción de insulina a través del aumento en los niveles de grelina observados *in vivo*. Pero, aparte de este efecto indirecto del D-Pinitol sobre la secreción de insulina, nuestros hallazgos *in vitro* sobre células INS-1E apoyan la noción de que el D-Pinitol inhibe la secreción de insulina de forma directa sobre las células β . En las células INS-1E de hecho se aprecia que la activación de ERK1/2, que es inducida por una alta concentración de glucosa, un mecanismo molecular dependiente de Ca^{2+} y vinculado a la activación de la producción y secreción de insulina (56), está claramente disminuida en presencia de D-Pinitol. En cualquiera de los casos, sea de forma indirecta o directa, lo que es patente es la bajada de los niveles de insulina tras 60 min de una toma de D-Pinitol en ayunas.

Mediante ensayos de tolerancia a la glucosa (GTT), se ha podido constatar que la ingesta de D-Pinitol 30 min antes de la administración de una alta carga de glucosa, promueve un cierto retraso en la disminución de la hiperglucemia originada. Asimismo, las observaciones en pruebas de tolerancia a insulina (ITT), muestran una menor capacidad de la insulina exógena para reducir la concentración de glucosa en sangre de ratas previamente tratadas con D-Pinitol. En general, estos resultados sugieren que, al disminuir la insulina endógena, las ratas tratadas con D-Pinitol en ayunas presentan una ligera desventaja a la hora de metabolizar la glucosa de forma rápida.

En relación a lo anteriormente descrito, es interesante también destacar que cuando se coadministró una alta concentración de **glucosa y D-Pinitol** en ratas, se produjo un incremento en los niveles de insulina en plasma iguales a los alcanzados con glucosa sola, que no pudieron ser contrarrestados por la presencia de este inositol (Figura Suplementaria 5B de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). No obstante, la recuperación de los niveles basales de insulina resultó más rápida en presencia de D-Pinitol que con glucosa sola. Sumado a esto, la consiguiente activación de la Akt hepática mediada por la señalización de la insulina no se vio afectada por el D-Pinitol (Figura Suplementaria 5C de Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*). Una posible explicación a estos resultados es la conocida acción antagónica de una alta

concentración glucosa sobre la secreción de grelina (527), lo que apoya además que los efectos inhibitorios del D-Pinitol sobre la secreción de insulina podrían ser mayores bajo una condición de ayuno, cuando los niveles de glucosa son basalmente bajos y la grelina puede actuar sobre el páncreas.

Una limitación a tener en cuenta en este primer estudio es la falta de información sobre la acción del D-Pinitol en el músculo esquelético en condiciones de ayunas, además de sobre otros tejidos que responden metabólicamente a la insulina, como el tejido adiposo o el cerebro. Datos obtenidos por nuestro grupo en estudios paralelos a esta tesis, muestran que el D-Pinitol sí que es capaz de activar la vía PI3K-Akt en hipotálamo en condiciones de ayuno (64). Otros grupos también han demostrado que el D-Pinitol activa esta vía canónica de señalización de la insulina en músculo e hígado, pero se tratan de modelos diabéticos y/o en estado posprandial (45,52,53,417). **Todo esto sugiere una acción del D-Pinitol específica no solo de tejido sino también del estado de alimentación.** Una posible solución a algunas de estas cuestiones sería realizar un estudio “clamp” de glucosa en animales que reciben D-Pinitol, un estudio que se abordará en futuros proyectos.

9.2. Estudio 2. Farmacocinética y efectos endocrino-metabólicos del D-Pinitol, como producto aislado o como ingrediente de un jarabe natural, administrado en ayunas en un modelo humano (publicado en Navarro JA et al., 2022, *Nutrients*)

En este estudio se llevó a cabo la caracterización farmacocinética del D-Pinitol administrado de forma oral a voluntarios humanos en condiciones de ayuno. Para ello, se estudió la absorción en plasma de D-Pinitol tras una toma única del compuesto puro (98% de pureza) y se comparó con la absorción de una toma única de un jarabe natural que presenta D-Pinitol en su composición, y que fue administrado a una dosis de 50 g totales de carbohidratos. En una segunda parte de este estudio se analizaron los efectos endocrinos y metabólicos de la administración aguda de D-Pinitol, en relación a los niveles plasmáticos de determinadas hormonas, así como los de ácidos grasos libres.

En relación a la farmacocinética, los datos sobre las concentraciones de D-Pinitol en plasma revelan que después de una única ingesta de este inositol puro (**15 mg/Kg**) y en **estado de ayuno**, sigue un período prolongado de absorción que dura casi 4 horas, disminuyendo sus niveles a partir de entonces. En el diseño experimental de este estudio se incluyeron tiempos de muestreo más largos (6 y 24 horas después de la ingestión) que los investigados en otros estudios previos que restringieron el análisis de las concentraciones de D-Pinitol a las primeras 4 horas posteriores a la administración, lo que complica una estimación a más largo plazo de las propiedades farmacocinéticas de este compuesto (47,50). Al incluir tiempos más largos, se pudo determinar que la vida media del D-Pinitol en el organismo humano alcanza las 5 horas y 30 min. Este valor de larga vida media permite la cobertura de largos períodos postprandiales, como los nocturnos, donde el D-Pinitol podría ejercer sus efectos después de una sola administración. Las concentraciones máximas de D-Pinitol en plasma (C_{max} de 1392 ng/mL o **7,17 μ M**) se observaron a las 4 horas en este estudio, en el que la dosis se ajustó al peso de cada sujeto. Comparando estos valores con los obtenidos en rata, se observa que el aclaramiento del D-Pinitol está sujeto a la tasa metabólica de la especie, siendo mucho más rápido en los roedores.

En ensayos realizados por otros autores en los que se administró **1 g** de D-Pinitol por sujeto de estudio, formando parte de un brebaje (**sin carbohidratos**) y en una sola toma, se describen concentraciones máximas en plasma de alrededor de **10 μ M** a las 3 horas y de **9 μ M**

a las 4 horas (50). Otro estudio anterior reveló que tras la ingesta de dosis más altas de D-Pinitol (**2,5 g** por sujeto) como ingrediente de un jarabe natural (**con carbohidratos**), se alcanzó una Cmax menor de la esperada (1670 ng/mL o **8,6 μ M**) a las 4 horas (47). En referencia a estas observaciones, es muy importante resaltar el hecho de que estos estudios previos mencionados se basaron en experimentos donde la administración de D-Pinitol se producía en el contexto de una carga de glucosa o formando parte de un brebaje. En realidad, el valor de la Cmax del estudio que administró 2,5 g de D-Pinitol como ingrediente de un jarabe natural, no duplicó la Cmax del estudio de esta tesis en el que las dosis empleadas de D-Pinitol puro estuvieron en el rango de **0,75-1,3 g/persona** (dependiendo del peso del sujeto). El hecho de que existiera solo una pequeña diferencia entre las Cmax de ambos estudios, aún con la diferencia en la cantidad de D-Pinitol ingerida, indica que la absorción del D-Pinitol se reduce en presencia de carbohidratos (principalmente monosacáridos, y especialmente glucosa), probablemente debido a la competencia de la glucosa y la fructosa por el transportador del inositol (57). Teniendo en cuenta estos datos en la bibliografía, se emprendió otra fase del estudio en el que se administraba D-Pinitol como integrante natural del **jarabe de algarroba**, que además de D-Pinitol, presenta varios monosacáridos y sacarosa en su composición (45,6% glucosa, 47,3% fructosa, 0,5% sacarosa y 3,2% D-Pinitol). La dosis de jarabe de algarroba administrada fue la equivalente a **1,6 g** de D-Pinitol por sujeto (**22,8 mg D-Pinitol/Kg de peso**), es decir, un **40%** superior a la utilizada en nuestro estudio anterior en el que se administró D-Pinitol puro. Con esta dosis se pudo comprobar que tanto la vida media como la Cmax fueron muy parecidas a las obtenidas con la dosis de 15 mg/Kg de D-Pinitol puro, alcanzando 1492 ng/ml. Sin embargo, el Tmax (tiempo en el que se alcanza la máxima concentración en sangre) del D-Pinitol del jarabe se redujo a los 90 min en comparación con el D-Pinitol puro, cuyo Tmax se alcanzaba a los 240 min. Todo esto refuerza la idea mencionada de que la administración en compañía de monosacáridos obstaculiza la absorción del D-Pinitol.

En relación a este hecho anterior, se corroboró que al comparar la capacidad de absorción de dos dosis de D-Pinitol puro, de 5 y de 15 mg/Kg, las cinéticas de D-Pinitol en plasma eran similares para ambas dosis, siendo la absorción proporcional a la dosis administrada, ya que no se observó un aumento o una disminución de las concentraciones plasmáticas sobre las esperadas. Por tanto, esto refuerza la noción de que la absorción del D-Pinitol no depende tanto de la concentración administrada, sino de la presencia de monosacáridos que puedan disminuir la aparición del inositol en plasma.

Otra novedad de este estudio fue la descripción de **los efectos metabólicos y endocrinos** del D-Pinitol tanto sobre la glucemia, como sobre la secreción de hormonas relacionadas con la homeostasis de la glucosa en un modelo humano en ayunas. La administración de 15 mg/Kg de D-Pinitol resultó en un **perfil metabólico muy similar al encontrado en el anterior modelo preclínico de rata**. De hecho, en humanos también se observó una disminución de la insulinemia a los 90, 120 y 180 min posteriores a la toma de D-Pinitol. Este perfil metabólico se explicó en los modelos preclínicos *in vivo* e *in vitro* del primer estudio de esta tesis (Navarro JA et al., 2020, *Nutrients*) por dos mecanismos: a) una acción inhibitoria directa del D-Pinitol sobre la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas, a través de la modulación de la señalización de ERK1/2; y b) una inhibición de la secreción de insulina ejercida por la grelina, cuyos niveles se vieron aumentados tras la administración de D-Pinitol en ayunas. En ausencia de datos experimentales sobre las acciones del D-Pinitol en islotes pancreáticos o en hepatocitos humanos, no se puede confirmar el efecto sobre la señalización de ERK1/2 en humanos. Sin embargo, sí se observa un incremento de los niveles plasmáticos de grelina acilada (forma activa) 60 min después de la ingesta de D-Pinitol, lo que reproduce básicamente los hallazgos en el modelo animal del primer estudio.

De igual modo, coincidiendo con los resultados obtenidos en el primer estudio, la disminución de insulina en plasma fue en paralelo a aumentos en los niveles de glucagón

durante el intervalo de 3 horas analizado. Este hallazgo va en concordancia con los estudios preclínicos en los que se observó una **disminución** significativa en la expresión génica de la enzima piruvato quinasa en hígado, lo que posiblemente contribuya a ralentizar la glucólisis y favorecer la exportación de glucosa al torrente sanguíneo. Pero, lo más sorprendente de estos estudios es la estabilidad de la glucemia a pesar de la reducción en la secreción de insulina y los aumentos de glucagón, pues el aumento de la ratio glucagón/insulina debería favorecer una gluconeogénesis, así como una disminución en la captación de glucosa y, por tanto, promover un aumento de la glucemia en sangre. Sin embargo, al igual que lo que se observó en el modelo animal, en humanos se establece una normoglucemia. Todos estos datos van en línea con los hallazgos del primer estudio presentado en esta tesis, y en el que se discute la posibilidad de que el D-Pinitol en ayunas ejerza su acción sobre el músculo para incentivar la captación de glucosa sanguínea, causando una hipoglucemia transitoria en los primeros minutos tras la administración. En este caso el D-Pinitol actuaría como un insulino-mimético en miocitos. Observando las gráficas de la Figura 4 de Navarro JA et al., 2022, *Nutrients*, se puede apreciar una tendencia, casi imperceptible, a disminuir los niveles de glucosa en sangre a la vez que aumentan significativamente los de glucagón a los 15 min tras la toma de D-Pinitol. A los 30 min se observa ya una bajada importante en la concentración de insulina a la vez que sigue aumentando la de glucagón, y a los 60 min aparece el pico en la concentración de grelina. Esto es compatible con un estado de ayuno prolongado en el que los niveles de glucosa en sangre no descienden porque se incentiva la gluconeogénesis en el hígado promovida por la acción del glucagón, mientras que la acción de la insulina se encuentra desfavorecida. En general, los índices HOMA-IR y HOMA- β resultantes de estas acciones metabólicas opuestas reflejan una estabilidad en la homeostasis de la glucosa, a pesar de la reducción neta en la secreción de insulina y el aumento de la del glucagón.

Entre las consecuencias de las acciones fisiológicas de la insulina se encuentra el descenso de los ácidos grasos libres (FFA) en plasma, ya que la insulina promueve la lipogénesis y disminuye la oxidación de ácidos grasos en tejido adiposo y hepático. Sin embargo, en este estudio se ha comprobado que el tratamiento con D-Pinitol **no resultó en una disminución de los FFA circulantes** (Figura Suplementaria 2 de Navarro JA et al., 2022, *Nutrients*), lo que apunta a que el D-Pinitol en estos dos tejidos insulino-sensibles no se comporta precisamente como la insulina. Además, tal y como se ha comentado con anterioridad, se observa una disminución de los niveles de insulina en sangre en aras de los niveles de glucagón. Dado que el glucagón promueve la liberación de ácidos grasos libres en humanos (528), incentivando la lipólisis y bloqueando su síntesis *de novo*, se puede interpretar que el D-Pinitol sostiene la liberación de FFA a través de las acciones del glucagón. Este hallazgo puede tener un potencial terapéutico muy interesante en la **esteatohepatitis no alcohólica (NASH)**, donde el consumo de D-Pinitol podría reducir la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina reduciendo los depósitos de ácidos grasos; algunos datos publicados recientemente respaldarían este punto de vista (58).

Con respecto al conjunto de efectos que produce una dosis más baja de D-Pinitol (5 mg/Kg), es de destacar que a los tiempos medidos de 60 y 120 min no se observaron diferencias sobre los niveles séricos de glucosa, insulina, glucagón o ácidos grasos libres, ni tampoco se detectaron cambios en el HOMA-IR. Se necesita más investigación para aclarar cuál es la dosis mínima requerida para detectar efectos beneficiosos del D-Pinitol en humanos.

El hecho de que la administración de D-Pinitol diera como resultado una mayor liberación de grelina, junto con los conocidos efectos de los inositoles en el eje gonadal (59,60), nos llevó a examinar el impacto de este compuesto en los niveles circulantes de hormonas pituitarias. Sorprendentemente, el D-Pinitol, a las dosis estudiadas, **solo afectó negativamente a la secreción de la hormona del crecimiento (GH)**, mientras que las concentraciones circulantes de PRL, TSH o gonadotropinas (LH, FSH) no sufrieron cambios. La

disminución de GH resultaba intrigante porque se esperaba un perfil opuesto. Por una parte, el aumento de la grelina, que es un secretagogo de la GH, debería de aumentar sus niveles. Y por otra, la disminución de la insulina, que es un inhibidor de la liberación de GH por parte de las células somatotrofas (61–63), también debería hacer que los niveles de GH aumentaran. En este sentido, algunos datos experimentales en modelos animales podrían explicar este resultado inesperado (64), estos datos sugieren que el D-Pinitol podría ejercer por sí mismo una potente acción insulino-mimética en el hipotálamo (actuando sobre la cascada de señalización del receptor de insulina, pero no a través de un efecto directo sobre los propios receptores) (64), y potencialmente en las células somatotrofas, llevando a una desregulación del control hipotalámico de la GH a través de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH); así que de esta manera, a través de su capacidad insulino-mimética en el hipotálamo, el D-Pinitol podría ejercer un efecto inhibitorio directo sobre la secreción pituitaria de GH (62,63). Aunque aún se desconoce si este efecto estimulante del D-Pinitol sobre la señalización de la insulina en hipotálamo ocurre en humanos. La ausencia de un efecto inhibitorio del D-Pinitol sobre la FSH también es un hallazgo relevante en el contexto de la obesidad y la resistencia a la insulina, ya que el déficit de esta hormona se ha relacionado con la NASH en estudios poblacionales (529).

También resulta interesante el hallazgo de que el D-Pinitol reduce los niveles de cortisol, un glucocorticoide que aumenta la glucemia, este hecho podría incidir en una reducción de la necesidad de insulina pancreática adicional. Sin embargo, en ausencia de datos que evalúen el impacto del D-Pinitol en la secreción de la hormona adrenocorticotrópica pituitaria (ACTH), no se puede identificar si los efectos sobre la secreción de cortisol se ejercen directamente en la glándula suprarrenal o a través de la interrupción del control hipotalámico/pituitario de la secreción de ACTH.

En general, este estudio en humanos respalda la noción de que el consumo de D-Pinitol presenta un efecto protector/preventivo en el páncreas endocrino, al reducir la carga de secreción de insulina y, por lo tanto, reducir uno de los principales factores que contribuyen a la resistencia a esta hormona. Este es un nuevo enfoque complementario a las acciones insulino-miméticas del D-Pinitol aplicable al contexto de la diabetes tipo 2 (53,481,519). Además, se sugiere un posible papel preventivo del D-Pinitol en el desarrollo de la esteatosis hepática, a través del efecto estimulador de la secreción de glucagón, que debería de incentivar la lipólisis y el trasiego de ácidos grasos libres al hígado para su posterior oxidación en la mitocondria. Sin embargo, aún se necesita más investigación para esclarecer completamente este hipotético papel terapéutico de la ingesta de D-Pinitol. También se hace imprescindible estudiar la farmacocinética del D-Pinitol después de una administración repetida, para aclarar qué cambios adaptativos se producen en su metabolismo/eliminación, así como para identificar si la farmacocinética está influenciada por otros elementos de la dieta, por la existencia de obesidad/diabetes o por la presencia de factores asociados a la edad (como la menopausia). En cualquier caso, este estudio establece un marco para explorar la utilidad de este compuesto como suplemento alimenticio.

Los datos obtenidos en este estudio podrían ayudar a establecer un potencial uso del D-Pinitol como protagonista en una estrategia dietética para luchar contra la resistencia a la insulina y la T2DM (ya sea administrado en solitario o como ingrediente activo en preparados alimenticios), si bien existen varias limitaciones a tener en cuenta. La primera reside en que el número de sujetos sometidos al tratamiento fue pequeño, lo que podría afectar a la evaluación de ciertos efectos endocrinos, especialmente a los relacionados con hormonas de secreción pulsátil (como las gonadotropinas) u hormonas afectadas por el ritmo circadiano (glucocorticoides). Esto es especialmente importante en el caso de las mujeres, ya que no se registró la fase del ciclo menstrual de las voluntarias, un factor que debe tenerse en cuenta en futuros enfoques experimentales. Sin embargo, se puede considerar que el tamaño muestral

elegido es consistente con los objetivos del estudio, y suficiente para determinar los parámetros farmacocinéticos de la administración oral de D-Pinitol, propósito principal de esta investigación. Además, es notorio que las acciones farmacológicas del D-Pinitol en la red endocrina grelina-insulina-glucagón que se han obtenido en este estudio en humanos, están en consonancia con los resultados obtenidos en el anterior estudio preclínico en roedores. La segunda limitación importante, en relación con la anterior, viene de la necesidad de aumentar el número de sujetos masculinos y femeninos, y de esta forma poder diferenciar claramente las posibles respuestas dependientes del sexo. Finalmente, más que una limitación, se impone la necesidad de abordar en un futuro un estudio que compare las acciones directas del D-Pinitol y del D-Chiro-inositol, para así poder comprobar que los efectos del D-Pinitol son propios de este compuesto y no de su conversión a D-Chiro-inositol, dado que esta conversión se puede dar por desmetilación ácida en el estómago.

9.3. Estudio 3. Efectos metabólicos y endocrinos del jarabe de algarroba para su uso potencial como edulcorante natural en humanos (publicado en Navarro JA et al., 2022, *Pharmaceutics*)

9.3.1. Primera parte: efectos de la administración aguda de jarabe de algarroba en voluntarios humanos sanos en ayunas

Como ya se ha mencionado en este trabajo de tesis, los edulcorantes artificiales no nutritivos, así como otros azúcares sustitutivos de la sacarosa (azúcar de mesa), como la fructosa, se han usado en el pasado y se usan en la actualidad por sus propiedades altamente endulzantes y, en principio, para evitar la obesidad y la diabetes. El uso de la fructosa para reemplazar a la sacarosa se ha generalizado en la sociedad occidental por la percepción de ser más saludable, primero porque al tener un mayor poder endulzante se consume en menor cantidad, segundo por su bajo índice glucémico, y tercero porque no requiere de la insulina para ser incorporada a la célula. Tanto es así, que muchos productos alimentarios, como el jarabe de maíz o el jarabe de agave, contienen altas cantidades de fructosa como sustituto de la sacarosa. Sin embargo, hay cada vez más evidencias de que este tipo de edulcorantes, lejos de ser beneficiosos, están generando **serios problemas de salud**, hasta el punto de que se les atribuyen múltiples complicaciones asociadas precisamente a las enfermedades metabólicas que tratan de evitar: obesidad y diabetes, muy relacionadas entre sí. Por ejemplo, hoy se conoce que el consumo de fructosa como edulcorante habitual contribuye a la obesidad y a la esteatosis hepática, y que los edulcorantes artificiales no nutritivos generan disbiosis intestinal complicando la función metabólica del hígado.

El interés de este tercer estudio, publicado en la revista *Pharmaceutics*, reside en proporcionar evidencias de la posibilidad de atenuar el impacto fisiológico que supone la ingesta de endulzantes calóricos mediante el refuerzo de mecanismos moduladores endógenos, que ayudan tanto a mantener el peso como a sostener el gasto de energía. Para este propósito se usó un diseño sencillo: una solución en forma de jarabe de algarroba que contiene una **composición equilibrada de fructosa, glucosa y un sensibilizador natural de la insulina como el D-Pinitol** (45,47,53,481,530,531) que, como se ha comprobado en los dos estudios anteriores de esta tesis, es capaz de aumentar la secreción de glucagón y grelina, al mismo tiempo que reduce los requisitos de insulina. Esta composición se comparó con la del jarabe de agave comercial que, entre los azúcares que presenta, contiene alrededor de un 75% de fructosa (incluyendo fructosa presente en forma de fructanos) y un 20% de glucosa. De hecho, una de las principales críticas al uso de extractos complejos que contienen edulcorantes

radica precisamente en su composición desconocida, que hace imposible comprender completamente las propiedades farmacológicas de estas sustancias. El uso de una composición simple y conocida como glucosa/fructosa/D-Pinitol contenida en el jarabe de algarroba nos permite comprender mejor tanto sus efectos farmacológicos como su impacto fisiológico.

Junto con un aumento de los niveles de D-Pinitol en plasma, nuestro estudio en humanos en ayunas refleja claramente que, tras una toma única de jarabe natural de algarroba, manteniendo la palatabilidad dulce y el valor calórico correspondiente, se producen **excursiones de glucosa en sangre más cortas** en el tiempo que las observadas con la ingesta de solo glucosa. Además, tanto el porcentaje de cambio de la concentración de glucosa en sangre con respecto a los niveles basales (preingesta) como la liberación de insulina inducida por la administración del jarabe de algarroba, tuvieron menor intensidad y duración que los observados con la ingesta de solo glucosa. Es lógico que el jarabe de agave, un endulzante a base de fructosa fundamentalmente, tuviera mejores respuestas asociadas a los niveles de glucosa e insulina en sangre, pero no se debe ignorar el lado oscuro metabólico de la fructosa (280,281,283,284), y, por tanto, se recomienda la moderación de su consumo, a menos que exista una intolerancia médica relevante. Los resultados obtenidos en humanos tras la toma de jarabe de algarroba sugieren que es la presencia de D-Pinitol en su composición lo que permite **moderar el índice glucémico**, mejorando tanto el manejo que el organismo hace de la glucosa, como la respuesta de la insulina, lo que se traduce en un índice HOMA-IR más reducido. Además, es un jarabe con un alto poder edulcorante, por lo que la cantidad necesaria para endulzar un alimento se reduciría en comparación con el uso de glucosa sola.

Resulta de interés también, desde el punto de vista dietético y fisiológico, que la presencia de fructosa y glucosa en el jarabe **no se asoció con una disminución de los ácidos grasos libres circulantes**, algo descrito tanto para la glucosa como especialmente para la fructosa (65), lo que sugiere que el D-Pinitol frena las acciones antilipolíticas/prolipogénicas de ambos monosacáridos. Además, las concentraciones plasmáticas de fructosa tras la ingesta del jarabe de algarroba son limitadas en el tiempo, al igual que en el caso de las concentraciones plasmáticas de glucosa, lo que sugiere un papel relevante del D-Pinitol en su regulación, ya que cabe señalar que, en comparación con el jarabe de agave, la duración e intensidad del pico plasmático de fructosa fue mucho menor al esperado. No obstante, la presencia de fructosa demanda más estudios para esclarecer los posibles efectos secundarios no deseados derivados del consumo repetido de jarabe de algarroba.

Otro resultado llamativo es que, a diferencia de lo que se observó en el segundo estudio de esta tesis en voluntarios humanos que ingerían una sola toma de D-Pinitol puro, tras la ingesta única de jarabe de algarroba no se apreció un aumento de la concentración plasmática de grelina con respecto a los niveles basales. Este resultado es comprensible por la presencia de glucosa en el jarabe, ya que puede estar inhibiendo la secreción de grelina tras su administración aguda. La medida de las concentraciones plasmáticas de diferentes hormonas pituitarias y gonadotropinas (PRL, TSH, LH, FSH) tras la administración del jarabe de algarroba, no mostró cambios significativos con respecto a los niveles basales; no obstante, se apreciaron diferencias ligadas al sexo para algunas de estas hormonas, por lo que son necesarios estudios con mayor número de sujetos. Y es que esta parte del tercer estudio explora las acciones agudas del jarabe de algarroba en un número reducido de voluntarios humanos, y este pequeño tamaño muestral se convierte en una limitación. Se necesitan estudios futuros con un **mayor número de voluntarios tanto masculinos como femeninos**, además de estudios que utilicen un diseño intrasujeto (el mismo individuo recibe todos los tratamientos), y así comparar mejor las acciones del jarabe de algarroba con respecto a otros edulcorantes como el jarabe de agave o el jarabe de maíz alto en fructosa (HFCS). Por supuesto, existe la necesidad de estudiar el impacto de este tipo de edulcorante funcional en la población diabética.

9.3.2. Segunda parte: efectos de la administración aguda y crónica de jarabe de algarroba en ratas Wistar

El estudio en humanos se complementó con ensayos sobre un modelo de rata Wistar, empleando para ello solo machos. En primer lugar, era necesario comprobar que la disminución de la excursión de glucosa en sangre observada tras la administración del jarabe de algarroba en humanos (en comparación con la administración de solo glucosa) no se derivaba de la diferente cantidad de glucosa ingerida. Con este fin, a un grupo de animales se les administró una sola dosis de glucosa pura (2 g/Kg), mientras que otro grupo recibió una sola dosis de jarabe de algarroba que contuviera, además de los otros ingredientes, la misma cantidad de glucosa (2 g/Kg de glucosa, 2,1 g/Kg de fructosa y 130 mg/Kg de D-Pinitol). Los resultados indicaron claramente que la variación de la glucemia fue sustancialmente menor en los animales que recibieron el jarabe, lo que respalda la actividad insulino-mimética que ejerce el D-Pinitol a nivel sistémico.

En esta parte del estudio en el modelo de rata Wistar, se testó los efectos metabólicos que podía producir la toma **crónica de jarabe de algarroba** durante 10 días. A la vez, y de forma complementaria, también se llevó a cabo un estudio paralelo en el que se administraba D-Pinitol puro disuelto en la bebida (100 mg/Kg/día) durante esos 10 días.

La administración crónica de jarabe de algarroba disuelto en la bebida, equivalente a recibir diariamente 100 mg/Kg de D-Pinitol (junto con 1,48 g/Kg de fructosa y 1,43 g/kg de glucosa), mejoró claramente la glucemia cuando se sometió a los animales a una prueba de tolerancia a la glucosa el día 8 de tratamiento, en comparación con animales que solo tomaron agua durante esos 8 días. Al término del estudio, tras 10 días, a diferencia de lo que ocurría con los tratamientos agudos con D-Pinitol puro o con jarabe de algarroba en animales y humanos, **no se observó que el tratamiento crónico con D-Pinitol puro ni con jarabe de algarroba redujeran la concentración de insulina en plasma a pesar de que los niveles plasmáticos de grelina (un inhibidor de la secreción de insulina) aumentaron en el grupo de animales tratados con el jarabe**. En relación a esto último, aunque no se midió la ingesta de alimento ni el gasto energético en este modelo animal, datos preliminares sugieren que el D-Pinitol no afecta al comportamiento alimentario. Asimismo, a pesar de que no se detectó un aumento significativo de los niveles de glucagón en sangre, sí que se pudo apreciar en ambos tratamientos crónicos (D-Pinitol puro y jarabe de algarroba) una tendencia a aumentarlos. De hecho, se aprecia **una tendencia (no significativa) a aumentar la ratio glucagón/insulina**, un efecto que ya se describió en los dos primeros estudios de esta tesis referente a los tratamientos agudos con D-Pinitol puro en ratas y a los ensayos en humanos tanto con D-Pinitol puro como con jarabe. Es decir, se mantiene un carácter metabólico “pro-glucagón” en presencia de D-Pinitol administrado de forma crónica tanto en su estado puro como formando parte del jarabe.

De especial interés resultó que los **depósitos de grasa y de glucógeno en el hígado disminuyeran** tras el tratamiento crónico con jarabe de algarroba. Una explicación plausible para esta disminución del contenido de grasa en el hígado, es que la ingesta de D-Pinitol presente en el jarabe redirige el metabolismo hepático hacia la exportación de glucosa y la oxidación de lípidos, un aspecto que tiene relación con la función del glucagón. Esta idea se vio sustentada en los resultados en los que se puede observar una potenciación de la expresión de genes de enzimas implicadas en la gluconeogénesis, como *Pck1* (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1) y *G6pc* (subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa). También se observa una intensificación de la ruta de β -oxidación de los ácidos grasos, reflejada en el aumento de la expresión génica de *Acox-1* (acil-coenzima A oxidasa 1) y *Cpt1* (carnitina palmitoiltransferasa 1), así como de la fosforilación oxidativa en mitocondria manifestada por la expresión incrementada de *Cox4i1* (isoforma 1 de la subunidad IV de la enzima citocromo c oxidasa).

Cabe destacar también que, tanto en el tratamiento crónico de jarabe como en el de D-Pinitol puro, **aumentaron las concentraciones plasmáticas de urea**, lo que sugiere una activación de la ruta del glucagón en hígado. El glucagón es una hormona secretada por las células α de los islotes pancreáticos, y presenta unos efectos opuestos a la insulina, manteniendo la glucemia al promover la gluconeogénesis y liberar glucosa a partir de las reservas de glucógeno del hígado (532). Además, el glucagón inhibe la síntesis *de novo* de lípidos e impulsa el catabolismo de proteínas, lo que genera nitrógeno que debe ser eliminado en forma de urea a través del ciclo correspondiente en el hígado (520,528). Estas acciones fisiológicas coinciden con el perfil metabólico que se observó en los animales que recibieron la administración de jarabe de algarroba, donde se aprecia una disminución en el contenido de grasa y en el glucógeno hepáticos, así como un aumento en la urea plasmática. En el experimento paralelo, donde se administraba D-Pinitol puro disuelto en la bebida durante 10 días, también se apreció este perfil, con un **aumento en la producción de urea y una disminución en el contenido de grasa en el hígado**. Dado que el aclaramiento de creatinina es normal con ambos tratamientos, podemos descartar que la urea proceda de una alteración del funcionamiento renal.

No se detectó un aumento en los niveles plasmáticos de cuerpos cetónicos como β -hidroxibutirato o cetonas tras los 10 días de tratamiento con el jarabe de algarroba, lo que indica que el aumento en la β -oxidación de ácidos grasos no se usó para generar cuerpos cetónicos como proveedores de glucosa. Este resultado también se observó en el modelo humano, donde los niveles plasmáticos de β -hidroxibutirato y de cetonas no aumentaron tras la ingesta aguda de jarabe de algarroba.

Sumado a todo lo anterior, cabe añadir que no se encontró un aumento de malondialdehído en hígado, un marcador de peroxidación lipídica, lo que indica una ausencia de estrés oxidativo después del consumo de jarabe de algarroba. Por lo tanto, el perfil general del jarabe de algarroba es el de un **edulcorante seguro a corto/medio plazo**, que favorece las acciones del glucagón y que además es capaz de impedir los efectos no deseados de la fructosa, fuertemente relacionados con la esteatosis hepática. Por supuesto son necesarios más estudios, en los que se lleve a cabo una exposición al jarabe de algarroba a largo plazo (de 4 a 8 meses), para de esta forma asegurar completamente la ausencia de toxicidad asociada a la fructosa presente en su composición.

Es importante resaltar de nuevo que todo este conjunto de efectos que se encontró con el tratamiento crónico con jarabe de algarroba, se replicó en el experimento paralelo donde solo se administró D-Pinitol puro (también de forma crónica durante 10 días) y a la misma dosis que la recibida con el jarabe de algarroba, es decir, 100 mg/Kg diariamente, lo que apoya de forma robusta el papel directo del D-Pinitol en los efectos metabólicos observados. Además, los resultados de este estudio están de acuerdo con las acciones ya descritas del D-Pinitol, acciones que llegaron a impulsar ensayos clínicos para posicionar este inositol como un suplemento alimenticio usado en el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica (58).

Por otro lado, los efectos observados sobre la cascada de señalización de la insulina en hígado, después de 10 días de consumo de jarabe de algarroba, sugieren una fosforilación inhibitoria de GSK-3 α y GSK-3 β , impidiendo así la inactivación de la glucógeno sintasa, aunque es remarcable que la fosforilación de esta proteína no se vio afectada por el tratamiento. En cualquier caso, este hallazgo sugiere que el jarabe de algarroba no promueve el almacenamiento de glucógeno en el hígado, lo que va en línea con la reducción de glucógeno hepático encontrada.

Otro aspecto a comentar es que el perfil de los efectos del jarabe de algarroba sobre la cascada de señalización de la insulina en **hipocampo e hipotálamo** de rata Wistar fue muy

similar a los descritos en condiciones experimentales en las que se administró D-Pinitol en solitario (64,66). En el **hipocampo**, tanto la administración aguda como repetida de D-Pinitol no afectó a la señalización de la insulina, pero provocó la desfosforilación de la proteína tau (66). Este es exactamente el mismo perfil encontrado en el hipocampo de los animales a los que se les administró el jarabe de algarroba durante 10 días en el actual estudio. La posibilidad de que el jarabe presente acciones neuroprotectoras en un escenario de **taupatía** deberá estudiarse más en profundidad, abriendo una utilidad adicional de los inositoles en los procesos de envejecimiento y neurodegeneración (31). También cabe resaltar que, en otros estudios independientes, nuestro grupo ha observado que el efecto sobre la fosforilación de tau podría replicarse también en un modelo murino transgénico de la enfermedad de Alzheimer (3xTg) (66). En el caso del **hipotálamo**, donde la administración de D-Pinitol produce una activación general de la cascada de señalización de Akt (64), los efectos observados en los animales a los que se les administró jarabe de algarroba mostraron un patrón similar: tendencia a una fosforilación inhibitoria de GSK-3 β , fosforilación activadora de mTOR, y fosforilación inhibitoria de la glucógeno sintasa (aunque esta última observación necesitará de más investigación para esclarecer la función de GS en cerebro). En definitiva, este conjunto de resultados sugiere que el D-Pinitol presente en el jarabe de algarroba es bioactivo y que la presencia de glucosa y fructosa no afecta a sus propiedades farmacológicas en cerebro.

Dado que el D-Pinitol puede activar tanto la captación de glucosa en las células musculares (45) como la señalización de insulina canónica en el hipotálamo (64), la interpretación más plausible de los resultados de este estudio es que **este inositol favorece la transferencia de glucosa desde el hígado a otros tejidos, incluido el músculo**. Se desconoce de momento el impacto del D-Pinitol (administrado solo o formando parte de jarabe de algarroba) en la función del tejido adiposo o en el gasto energético, por lo que estos importantes aspectos se deberán abordar en futuros estudios para aumentar la comprensión del perfil farmacológico de este inositol. En cualquier caso, los hallazgos aquí presentados sugieren que el D-Pinitol no actúa igual en todos los tejidos; en algunos como el músculo o el hipotálamo se comportaría como un insulino-mimético, pero en hígado y probablemente en tejido adiposo, haría lo contrario. Sin olvidar que la acción del D-Pinitol en los diferentes tejidos también depende del estadio del ciclo ayuno/alimentación.

Para terminar, cabe decir que este estudio abre posibilidades muy prometedoras para el uso del jarabe de algarroba como alimento funcional, pero primero es importante analizar la posible toxicidad derivada de la exposición a muy largo plazo a este endulzante en modelos preclínicos, especialmente en comparación con la conocida toxicidad que produce la exposición crónica a edulcorantes ricos en fructosa como son el jarabe de agave o el jarabe de maíz.

9.4. Perspectivas de futuro

En esta tesis doctoral se ha profundizado en el estudio de las características farmacocinéticas del D-Pinitol, así como en sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa. Se ha establecido una relación directa entre la administración de D-Pinitol y el balance glucagón-insulina-grelina; de hecho, se ha descrito por primera vez los efectos del D-Pinitol sobre los niveles de grelina plasmática, estudio que nos permitió la publicación de una patente (498). Con estas propiedades en mente, se decidió dar un paso más y estudiar cómo la presencia de D-Pinitol en un jarabe azucarado de origen natural extraído de la pulpa de la algarroba, que contiene principalmente fructosa y glucosa, podría mejorar sus efectos sobre la glucemia, hecho que se ha conseguido probar; y, además se han identificado indicios de posibles beneficios del D-Pinitol en la mitigación de los efectos adversos asociados al consumo de fructosa.

En el actual contexto de pandemia de diabetes (cuya previsión no es favorable), todos estos efectos del D-Pinitol (administrado solo o formando parte del jarabe de algarroba), sumados a la ausencia de toxicidad, la posibilidad de administración oral y a su obtención a partir de fuentes naturales y renovables sin necesidad de síntesis química, lo convierten en un gran candidato para formar parte de diferentes tratamientos o dietas para prevenir/combater nuevos casos de obesidad y diabetes.

Por todo esto, es de vital importancia ampliar el conocimiento de los efectos de esta sustancia, aunque lo descrito hasta el momento parece positivo, hay que seguir estudiando el impacto del D-Pinitol en diferentes escenarios (usando para ello diferentes modelos animales, y estudios clínicos con un reclutamiento más específico), describir con mayor profundidad como puede ayudar a mejorar el perfil metabólico de endulzantes y, por supuesto, comprobar los efectos de una administración repetida a largo plazo. También hay que añadir la ventana de posibilidades que se abre al usar el D-Pinitol como parte del tratamiento en patologías como la esteatohepatitis no alcohólica o en enfermedades neurodegenerativas asociadas a taupatías, pero, de nuevo, se hace necesario mucha más investigación que aclare estos puntos.

Por tanto, nuestras perspectivas de futuro se basan en realizar estudios en diferentes escenarios a los descritos, para complementar la información que ya se tiene y terminar de esclarecer y perfilar los efectos metabólicos del D-Pinitol. Además, nuestro grupo ya cuenta con proyectos en marcha dónde se está evaluando el efecto de los inositoles D-Pinitol y D-Chiro-inositol en modelos murinos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer (5xFAD y 3xTg), los cuales están presentando resultados positivos muy prometedores.



10. CONCLUSIONES FINALES

Remitiéndonos a los objetivos anteriormente definidos, los propósitos globales de este trabajo eran la caracterización farmacocinética del D-Pinitol, la comprobación de su inocuidad, y la evaluación de su impacto en el control de la glucemia y en la respuesta insulínica. Todo esto con el fin de valorar el uso de este inositol, bien en forma de extracto puro o bien formando parte de un jarabe natural, como un endulzante natural alternativo de consumo bioseguro, que ofrezca beneficios sobre el metabolismo glucídico y lipídico.

De los hallazgos de esta tesis doctoral se pueden inferir las siguientes conclusiones:

- I. La administración oral de D-Pinitol (puro o formando parte de un jarabe natural de algarroba) muestra que es un producto **bioseguro**, exhibiendo una **rápida absorción** en ratas, siendo esta más lenta en humanos. Se demuestra además que la presencia de carbohidratos reduce parcialmente la absorción de D-Pinitol.
- II. La administración aguda de D-Pinitol en ayunas, tanto en ratas como en humanos, **reduce los niveles de insulina circulante** sin afectar a la glucemia, lo que favorece una disminución del índice HOMA-IR. Este hecho está relacionado con dos observaciones: por un lado, con el aumento de los niveles plasmáticos de grelina, y por otro, con la inhibición directa de la secreción de insulina en un modelo de células β . Estos efectos posicionan al D-Pinitol como un compuesto natural de gran valor **páncreo-protector**.
- III. La administración aguda de D-Pinitol en ayunas, tanto en ratas como en humanos, aumenta los niveles plasmáticos de glucagón, lo que, junto con la disminución de la insulinemia, **incrementa la ratio glucagón/insulina**. En ratas, este efecto se asocia con una **glucólisis hepática reducida**, así como con un estado **hipoactivo** del receptor de la insulina en hígado.
- IV. La administración aguda de jarabe de algarroba (el cual contiene glucosa, fructosa y D-Pinitol) genera un **índice glucémico moderadamente elevado** en humanos. Sin embargo, el incremento de insulina circulante es **menos intenso y más breve** que con la toma de glucosa pura, lo que eleva la ratio glucagón/insulina. En ratas, el jarabe promueve una captación de glucosa circulante más rápida que la glucosa pura.
- V. La administración crónica de jarabe de algarroba en ratas **reduce el contenido de grasa y glucógeno en hígado**, probablemente debido a una reorientación del metabolismo hepático hacia la exportación de glucosa y la oxidación de lípidos, lo que apoya una **mayor acción del glucagón** en este órgano.
- VI. La administración crónica de jarabe de algarroba en ratas muestra cierto impacto en áreas del cerebro. La vía de señalización de la insulina se activa de forma modesta en hipotálamo, lo que podría tener implicaciones en el control de la homeostasis y el metabolismo. Sin embargo, en hipocampo no se registra esta activación; pero sí se aprecia una clara **disminución de la fosforilación de la proteína tau**, lo que podría tener una repercusión importante en taupatías.
- VII. El jarabe de algarroba es un producto que, manteniendo una palatabilidad dulce y su valor calórico correspondiente, **mejora el metabolismo glucídico y lipídico**. Estas propiedades se atribuyen a la presencia de **D-Pinitol en su composición como un elemento bioactivo y seguro**.



11. EPÍLOGO

Los datos mostrados en esta tesis señalan que el D-Pinitol presenta acciones muy específicas más allá de su conocida incorporación a los glicanos (que actúan como mediadores de la señalización de la insulina), ya que este inositol es capaz de reducir la secreción de insulina, probablemente tanto de forma directa actuando sobre las células β , como de forma indirecta mediante el aumento de los niveles de grelina. Estos efectos podrían ayudar a proteger al páncreas endocrino, al aliviar a los islotes pancreáticos de una alta demanda de insulina que se produce en condiciones de resistencia a esta hormona. Esta propiedad hace del D-Pinitol, y por extensión, del jarabe de algarroba, unos suplementos dietéticos de potencial utilidad en un escenario prediabético (como obesidad, envejecimiento, etc.), en el que el páncreas se agota debido a una sobreproducción de insulina que no resulta eficaz a la hora de activar su receptor.

El hallazgo de la capacidad del D-Pinitol para inducir un aumento transitorio de los niveles circulantes de grelina, abre nuevas perspectivas sobre las acciones y el uso de este inositol en situaciones patológicas de sarcopenia o pérdida de peso por caquexia o anorexia.

Gracias a los estudios en humanos sanos en ayunas de esta tesis se corrobora que, cuando se administra puro, el D-Pinitol se incorpora rápidamente al torrente sanguíneo, con un período prolongado de absorción y una vida media larga. Su administración junto a carbohidratos resulta en una reducción parcial de su absorción, lo que sugiere que tal vez los máximos efectos del D-Pinitol se consiguen administrándolo en ausencia de otros alimentos.

Como ya se ha comentado, el D-Pinitol es capaz de reducir la insulinemia mientras mantiene la glucemia, y lo consigue a través de acciones coordinadas sobre la secreción de glucagón y grelina. Este perfil farmacológico sugiere que el uso de D-Pinitol como suplemento alimenticio podría ser una buena estrategia para ayudar a combatir las epidemias de resistencia a la insulina/T2DM que se han extendido por la mayoría de los países desarrollados.

Por otro lado, el uso de un jarabe natural de algarroba que presenta en su composición principalmente glucosa, fructosa y D-Pinitol, resultó en una mejora del índice glucémico (comparado con el observado cuando se administra solo glucosa), además de presentar un perfil seguro. Esta reducción del índice glucémico probablemente fue debida a la presencia de D-Pinitol en su composición, ya que, al igual que cuando se administró D-Pinitol en solitario, se vuelve a detectar una menor respuesta de la insulina y un aumento de la actividad del glucagón en tejido hepático.

Los resultados presentados muestran evidencias de que la administración de jarabe de algarroba presenta ventajas sobre otros jarabes que contienen altas cantidades de fructosa, como el de agave, que, aunque no generan picos de glucosa e insulina en sangre, sí producen una sobrecarga de fructosa que en hígado se convierte en grasa, contribuyendo a la aparición de esteatosis hepática, aumentos de LDL y colesterol en sangre, grasa visceral, resistencia a la insulina, síndrome metabólico y T2DM.

En definitiva, el jarabe de algarroba es un endulzante natural potente, por lo que las cantidades requeridas como edulcorante son mínimas, presentando las ventajas añadidas de poseer un bajo valor calórico y de ejercer un impacto beneficioso en el metabolismo de la glucosa. Pero se requiere de más investigación para comprobar si el D-Pinitol presente en el jarabe puede contrarrestar los efectos no deseados de una administración a largo plazo de fructosa, y para documentar si el uso de este "edulcorante funcional" es útil en el contexto de la obesidad y la diabetes.



12. ENGLISH SUMMARY AND CONCLUSIONS

12.1. Summary

12.1.1. Introduction

Diabetes mellitus and obesity

Diabetes and obesity are diseases that present a significant challenge to health systems worldwide due to their alarming prevalence. In 2021, 10.5% of the global population aged 20 to 79 had diabetes (1), while in 2020, 38% of individuals over the age of 5 were classified as overweight or obese (2). Given their close association, these two conditions have become intertwined pandemics, which has led to the coining of the term “**diabesity**”.

Diabetes mellitus is a chronic disease characterised by the development of heterogeneous metabolic disorders, with the primary consequence being persistent long-term hyperglycemia, which is associated with serious clinical complications. Diabetes can arise either from the pancreas's inability to produce insulin (due to the destruction or depletion of the insulin-secreting β -cells in the pancreatic islets), the body's impaired ability to use insulin effectively (insulin resistance), or a combination of both (3,4). Insulin is an essential hormone in metabolism. Synthesised by β -cells, **its secretion is stimulated by the influx of glucose**, and among its functions, the most notable is facilitating glucose uptake in myocytes and adipocytes thereby lowering blood glucose. It is therefore a key player in glucose homeostasis (5).

Diabetes mellitus is classified into several types depending on its characteristics, with the main categories being: type 1 diabetes mellitus (**T1DM**), type 2 (**T2DM**), gestational (**GDM**), and other specific types (such as type 3, **T3DM**, or brain insulin resistance). **T2DM** is the most common type of diabetes, affecting more than 90% of people with diabetes worldwide (1). T2DM is a consequence of complex interactions between genotype and lifestyle, which can result in scenarios where cells do not respond adequately to insulin due to failures in insulin receptor signalling, leading to **insulin resistance** and subsequent hyperglycaemia (1,6,7). At this point, to compensate for the ineffectiveness of insulin and restore normal blood glucose levels, there is an increase in the rate of insulin secretion by β -cells (6). If this state persists over time, the β -cells eventually lose their ability to compensate for insulin resistance, resulting in a decline in both their number and function due to apoptosis. This decline is driven by the intense response of these cells to elevated glucose levels, leading to mitochondrial dysfunction from stress and excessive production of reactive oxygen species (**ROS**). Consequently, this creates endoplasmic reticulum stress, which results in the generation of misfolded proteins (including insulin) and further ROS production. These interconnected processes lead to significant cytotoxicity, impaired insulin production, β -cell apoptosis, and the destruction of the islets of Langerhans, a condition ultimately termed “**pancreatic exhaustion**” (8). As β -cell dysfunction and insulin resistance are exacerbated, hyperglycaemia is amplified, leading inexorably to the development of **T2DM** (1,6,7,9).

Continuously high circulating glucose concentrations lead to increased oxidative processes with adverse effects on various tissues, especially in its microcirculation, generating diabetic-nephropathy, -retinopathy, -cardiomyopathy, etc. This means that the main consequence associated with diabetes is increased **oxidative stress**, which is involved in both the pathogenesis of the disease and its long-term complications.

For the development of T2DM, the most important single risk factor is excess body fat (10,11), associated with several metabolic abnormalities resulting in insulin resistance (12); thus, **overweight and obesity** are strongly linked to the development of T2DM (1,10). Obesity is a chronic multifactorial disease characterised by excessive fat deposits accumulation; it is

caused by an interaction between environmental factors and genetic predisposition leading to a positive energy balance in which calorie intake exceeds expenditure (13).

The relationship between obesity and diabetes is complex and not only boils down to the fact that obesity is a major risk factor for the development of T2DM, but also that **T2DM can lead to obesity**. People who are genetically predisposed to develop diabetes are at high risk of obesity due to increased fat production and storage (14).

The problem with artificial sweeteners

One of the key factors promoting obesity and T2DM is the excessive intake of carbohydrates, as the sweet taste of carbohydrates reinforces their intake and, at the same time, overloads the pancreas. Therefore, the emergence of processed foods sweetened with added sugars (e.g. high-fructose corn syrup) led to an increase in the prevalence of diseases such as obesity and T2DM. As an alternative to natural sugars used as sweeteners, artificial sweeteners (acesulfame potassium, aspartame, neotame, saccharin, etc.) have emerged. These substances contain very low or no calories while offering significant greater sweetness (15). With these characteristics, artificial sweeteners have become popular substitutes for table sugar and their use is increasing. However, a growing number of authors and studies indicate that their rapid and widespread consumption among the population has not been accompanied by a significant reduction in the problem of diabetes (16–18). Additionally, there is increasing controversy regarding the safety of these substances, as their excessive and prolonged consumption may have undesirable health consequences (19–22). There is evidence of a possible direct association between increased consumption of artificial sweeteners and increased risk of cardiovascular disease, hypertension, vascular inflammation/dysfunction or microbiota dysbiosis (23–30).

In light of this scenario, this study proposes investigating food supplements that improve the body's natural carbohydrate metabolism. The strategy involves incorporating **functional natural ingredients** into food formulations, preserving their palatability while helping the body in processing sugars efficiently thus preventing their excessive conversion into fat, and normalizing oxidative stress. Inositols, particularly D-Pinitol, are natural substances that, due to their beneficial properties, could serve as active ingredients for healthy sweeteners.

Inositols

Inositols are organic compounds similar to monosaccharides, widely distributed in nature, and characterized by a cyclic structure consisting of six carbons and six alcohol groups. As such, they are classified as sugar alcohols (polyols with a hydroxyl group attached to each carbon atom). In addition, both inositols and their methylated derivatives fall under the category of cyclitols, which are cycloalkanes containing at least three hydroxyl groups, each attached to a different carbon atom in the ring (31).

Depending on their structure, eight stereoisomers of inositol can be found in nature: myo-, scyllo-, muco-, epi-, neo-, allo-, D-chiro- and L-chiro-inositol. Many plant extracts are known to contain **methylated derivatives of inositols**, such as **D-Pinitol** (31). All eight inositol stereoisomers are found in varying concentrations in various plant tissues (32). In contrast, **myo-inositol (MI)**, **scyllo-inositol (SI)**, and **D-chiro-inositol (DCI)** have been detected as the main inositols present in bacteria and mammalian tissues (31).

Since inositols are very abundant in the cell membrane of plants and animals, they can be easily obtained through the diet (33,34). The most common form of inositol incorporation is free MI or in the form of **phytic acid**, with plants being the main sources. Another inositol that

is incorporated through the diet is DCI, but it is mainly obtained from its methylated form (**D-Pinitol**), as it undergoes a demethylation process in the gastrointestinal tract due to the conditions generated by the acidic secretions of the stomach.

Inositols themselves play an essential role in the organism, acting as osmolytes, intervening in different signalling pathways, or participating in vesicular endocytosis/exocytosis (35). However, their main function is as essential constituents of complex plasma membrane phospholipids: **phosphatidylinositols (PI)**, **glycosylphosphatidylinositols (GPI)** and **inositol phosphoglycans (IPGs) and derivatives**; these phospholipids, in addition to their structural function, participate in metabolic pathways as second messengers.

Inositols also play an important role in the **non-canonical insulin receptor signalling pathway**, which refers to cellular responses mediated by the insulin receptor upon binding to its ligand, involving the activation of a cascade of intracellular events alternative to the known classical pathways. Several pathways other than the canonical ones have been proposed, but one of them leads to the formation of **IPGs and derivatives**, which are involved in or incorporated into the classical insulin signalling pathway (36), acting as putative second messengers.

The involvement of inositols in insulin signalling pathways has led to the development of studies showing a direct effect of inositol administration on key players in these pathways (31), showing that inositols can act as sensitisers or even mimetics of the insulin, although the exact mechanism by which they act is unknown. Due to the insulin-mimetic properties of inositols (and derivatives), administration of these compounds has been shown to be effective in curbing insulin resistance and reducing postprandial glycaemia, as well as disorders associated with hyperglycaemia (37). However, the existence of studies showing a disparity in the results of inositol administration (38,39), shows that the effect of supplementation with these compounds may vary depending on various factors, some of which are still unknown (40). Therefore, this work attempts to describe in more detail the pharmacokinetics and effects of one particular inositol: D-Pinitol, whether administered alone or as part of a syrup composed mainly of glucose and fructose.

D-Pinitol

D-Pinitol (3-O-methyl-D-chiro-inositol, a methylated derivative of DCI) is naturally present in a multitude of plants, being particularly abundant in the *Pinus* genus, in the leaves of *Bougainvillea spectabilis*, and in the legume family (such as in the soya plant, *Glycine max*, or in the pods of the carob tree, *Ceratonia siliqua*) (41–44). Specifically, D-Pinitol can be isolated and industrially produced from carob tree, a native species that is widespread in the Mediterranean basin.

Plants rich in D-Pinitol have been used in traditional medicine as an empirical treatment for various disorders, such as diabetes, inflammation, cancer and infections (41). It is now known that this inositol has much greater pharmacological potential, as it has beneficial effects on a wide range of biological processes, including its role as: **antioxidant**, **anti-inflammatory**, **immunosuppressant**, **anticancer**, **antiosteoporosis agent**, **hepatoprotective**, **antisenescence** and, above all, **antidiabetic**.

Numerous studies demonstrate the potential of D-Pinitol as a therapeutic agent for the treatment of diabetes, primarily due to its ability to reduce blood glucose levels and its positive effects on other metabolic complications associated with this disease (improvement in lipid profiles, attenuation of oxidative stress, reduction of pro-inflammatory factors, or protection of liver, kidney and pancreatic tissues) (45–48). However, it is important to bear in

mind that there are still uncertainties regarding its mechanisms of action, as some studies have reported no beneficial effect of D-Pinitol on glycaemia or insulin sensitivity (49–51).

12.1.2. Hypothesis

In light of the aforementioned, this doctoral thesis aims to investigate the effects of the administration of D-Pinitol (both alone or in combination with sugars) in humans and in a rat model, focusing on specific metabolic actions that have yet to be uncovered. Accordingly, the following **general hypothesis** is proposed:

"Oral administration of the natural compound D-Pinitol is safe for both the short- and long-term; it is rapidly absorbed and distributed in plasma and liver. D-Pinitol can modulate insulin actions depending on the stage of the fasting/feeding cycle, which influences the secretion of insulin itself and other hormones involved in glucose homeostasis. As a result, it exerts a beneficial impact on both glucose and lipid metabolism".

In addition to the above-mentioned notions, one of the main challenges in the ongoing battle against the epidemics of obesity and T2DM is achieving nutritionally balanced intake of carbohydrates, both in terms of quantity and quality. The aim is to consume foods containing natural sweeteners, which, while retaining their palatable properties, support a healthy metabolic balance. One possible solution is the consumption of "functional foods", defined as those that, in addition to their nutritional value, contain biologically active components that provide some added "pharmacological" and health-promoting effect. Given the previously described benefits of D-Pinitol, it should be considered as an active and functional ingredient for formulation of "healthy sweeteners". Consequently, this study explored the effects of consuming a carob syrup primarily composed of glucose and fructose, but enriched with D-Pinitol, leading to the proposal of the following **secondary hypothesis**:

"The carob syrup, which is naturally enriched with D-Pinitol, not only retains the natural palatability and sweetening power from its glucose and fructose content, but also presents a lower glycemic index compared to these monosaccharides when administered in isolation. Furthermore, due to its pharmacological properties, it can improve carbohydrate and lipid metabolism, making it a functional food that serves as a biosafe alternative sweetener".

12.1.3. Aims

On the basis of the hypotheses set out above, five general aims are proposed:

- **Aim 1.** To characterise the pharmacokinetics of D-Pinitol and to test for possible toxicity after administration in a fasting *in vivo* model (rat), in order to subsequently assess its impact on glucose metabolism and the hormones that regulate it.
- **Aim 2.** To characterise in fasting healthy human volunteers the pharmacokinetics and endocrine effects of an oral administration of D-Pinitol, pure or as a component of a natural carob syrup.
- **Aim 3.** To evaluate the effects of acute oral administration of carob syrup on aspects that control and relate to insulin metabolic function, for consideration as a natural sweetener in obese and/or diabetic humans.
- **Aim 4.** To assess the effects of chronic administration of carob syrup (administered in drinking water) on aspects that control and relate to insulin metabolic function in plasma and liver tissue of Wistar rats, fed on a normal diet.

- **Aim 5.** To assess the effects of chronic administration of carob syrup (administered in drinking water) on aspects that control and relate to insulin function in hypothalamus and hippocampus of Wistar rats, fed on a normal diet.

12.1.4. Methodology

In order to respond to the different aims proposed, the methodology followed during the experimental work is summarised below.

Rat studies

Experiments were performed on 4- to 5-month-old male Wistar rats (CrI:WI(Han)) weighing 400 ± 20 g.

The animals were maintained under standard environmental conditions, fed with a standard pellet diet, and water and food were available *ad libitum*.

For the acute studies, the animals were fasted for 18 hours; then, for one of the experiments, D-Pinitol dissolved in water was administered orally at a concentration of 100 mg/kg or 500 mg/kg; after administration, the animals were sacrificed at different times and samples were collected for further analysis. For another experiment, one group of animals was given a dose of 2 g/kg of glucose diluted in water (orally), and another group was given a dose of carob syrup of 4.38 g/kg (glucose content 2 g/kg), also orally; after administration, blood glucose levels were monitored at different times.

For the chronic study, animals were administered for 10 days with D-Pinitol (100 mg/kg/day), or with carob syrup (dose adjusted to a daily amount of 100 mg/kg D-Pinitol), both compounds dissolved in water; after this time the animals were sacrificed and samples were collected for further analysis.

In addition, to test the effect of D-Pinitol on glycaemia, some animals were treated with a dose of 100 mg/kg D-Pinitol (oral) at different times before a glucose or insulin injection, for subsequent performance of a glucose tolerance test or an insulin tolerance test respectively.

Samples collected after the different experiments were stored at -80°C until processing and further biochemical analysis:

- **Pharmacokinetic analysis of D-Pinitol in plasma and liver.** Liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) method.
- **Measurement of plasma metabolites.** Glucose, urea, uric acid, creatinine, bilirubin, triglycerides, glutamate-oxaloacetate transaminase, glutamate-pyruvate transaminase and gamma-glutamyl transferase.
- **Measurement of hormones associated with glucose homeostasis and cytokines in plasma.** Leptin, adiponectin, insulin, ghrelin, glucagon and IGF-1.
- **HOMA index calculation.**
- **Monitoring of oxidative stress (malondialdehyde) and plasma ketone bodies.**
- **Measurement of glycogen and total lipid content in liver.**
- **Measurement and analysis of gene expression in liver.** The expression of different genes (*Fbp1*, *G6pc*, *Pc*, *Fasn*, *Acaca*, etc.) was quantified by qPCR.
- **Measurement and analysis of protein expression in liver, hypothalamus and hippocampus.** The relative quantity and activation state of different proteins (Akt, IRS-1, GSK-3, tau, etc.) was quantified by Western Blot.

Human studies

A total of 25 healthy volunteers were recruited from laboratory and clinical staff of the Neuropsychopharmacology Laboratory of the Hospital Regional Universitario de Málaga. All subjects showed an absence of obesity (BMI less than 30), as well as any diagnosed or treated metabolic disease.

All studies were conducted under fasting conditions. Depending on the study, subjects took an oral dose of D-Pinitol (15 mg/kg or 5 mg/kg), carob syrup (50 g), glucose (50 g) or agave syrup (50 g); all compounds were diluted in 100 mL of water. After ingestion, blood samples were taken from the subjects at different times for further analysis.

Plasma was extracted from the collected blood samples and stored at -80 °C until further biochemical analysis:

- **Quantification of D-Pinitol.** Liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) method.
- **Glucose and fructose concentration monitoring.**
- **Measurement of hormones that regulate glucose homeostasis.** Insulin, glucagon or active ghrelin.
- **Measurement of free fatty acids and ketone bodies.**
- **Calculation of the glycaemic index of carob syrup and the HOMA index.**
- **Monitoring of pituitary hormones, gonadotropins and cortisol.**

Cell culture and *in vitro* experimental design

Rat insulinoma INS-1E cells were cultured. They were incubated in medium with a basal concentration of glucose (3 mM) on the one hand, and in medium with a high concentration of glucose (11 mM) on the other hand, for 15 hours. Both groups were then stimulated for 30 min with different concentrations of D-Pinitol. Incubation was stopped, supernatants and protein lysate were collected to test the effect of D-Pinitol on insulin secretion and on insulin secretion-related proteins.

12.1.5. Results and discussion

The achievement of the proposed aims generated a series of results that have been published in three scientific papers, which are summarised below.

First publication. “D-Pinitol from *Ceratonia siliqua* is an orally active natural inositol that reduces pancreas insulin secretion and increases circulating ghrelin levels in Wistar rats”

This first study provides a new perspective on the oral absorption and metabolic effects of D-Pinitol under **fasting conditions**, when circulating glucose is expected to be at basal levels. **Rapid absorption, distribution and elimination of D-Pinitol in plasma and liver** were observed, **with no signs of toxicity**, opening the door to its use as an active nutritional ingredient.

In the fasting Wistar rat model used in this study, the main effect of D-Pinitol administration was a **significant reduction in circulating insulin levels**, which, together with an **increase in glucagon levels**, led to an increase in the glucagon/insulin ratio. This could be caused by an initial hypoglycaemia with a tendency to be prolonged. This possibility is based on the insulin-mimetic properties attributed to D-Pinitol in skeletal muscle, where it promotes the translocation of GLUT4 to the membrane (52), facilitating the uptake of circulating glucose

and reducing postprandial hyperglycaemia. It would therefore be conceivable that, under fasting conditions, D-Pinitol would promote transient hypoglycaemia in the first few minutes due to its action on muscle, an effect that was not detected in this study because measurements of metabolic and biochemical parameters began to be assessed 60 min after ingestion, sufficient time for the hepatic machinery of glucagon-mediated glycogenolysis and gluconeogenesis to be set in motion to balance blood glucose concentration, resulting in normoglycaemia. In fact, it is very plausible that the lowering of insulin levels is favoured by this possible initial hypoglycaemia. This is reflected in a **decrease in the insulin resistance index (HOMA-IR)**, and thus in an improvement in insulin sensitivity.

The results of this study also indicate that D-Pinitol would lead to a reduction of the glycolytic pathway in the liver through a decrease in *Pklr* gene expression, as a consequence of an increase in the glucagon/insulin ratio. Likewise, after D-Pinitol intake, inhibition of IRS-1 and Akt, and increased GSK-3 β activity in the liver were observed, pointing to a **hypoactive state of the insulin receptor** in this organ, which is also compatible with a fasting phase and the low insulin levels detected in plasma. Other works show that D-Pinitol can activate the PI3K/Akt pathway in the liver, but this effect is shown in a model of diabetes with overt hyperglycaemia (53).

Moreover, this study shows for the first time that administration of D-Pinitol results in an **increase in plasma ghrelin levels**. Ghrelin is known to inhibit insulin secretion in pancreatic cells (54,55), suggesting that D-Pinitol may exert an inhibitory effect on insulin secretion through the increase in ghrelin levels observed *in vivo*. But, apart from this indirect effect of D-Pinitol on insulin secretion, our *in vitro* findings on rat insulinoma INS-1E cells also support the notion that D-Pinitol inhibits insulin secretion directly on β -cells. In INS-1E cells, in fact, the activation of ERK1/2 (which is induced by high glucose concentration, a Ca²⁺ dependent molecular mechanism linked to the activation of insulin production and secretion (56)), is clearly diminished in the presence of D-Pinitol. In either case, indirectly or directly, what is evident is that there is a drop in insulin levels following D-Pinitol intake during fasting.

One limitation of this first study is the lack of information on the action of D-Pinitol on skeletal muscle under fasting conditions, as well as on other tissues that respond metabolically to insulin, such as adipose tissue and the brain. In any case, however, this work allows us to consider D-Pinitol as a natural product of great **pancreatoprotective** value, as it would prevent excessive insulin production, a key factor in the development of insulin resistance, leading to the depletion of the endocrine pancreas and the onset of type 2 diabetes.

Second publication. "Pharmacokinetics and endocrine effects of an oral dose of D-Pinitol in human fasting healthy volunteers"

The second study in this thesis shows the pharmacokinetic profile of D-Pinitol when administered pure orally (dissolved in water, 15 mg/kg) to fasting healthy human volunteers. The data reveal a **prolonged period of absorption and a long half-life**. It is noteworthy that another experimental group of volunteers consumed carob syrup, which in addition to D-Pinitol, has several monosaccharides and sucrose in its composition (45.6% glucose, 47.3% fructose, 0.5% sucrose and 3.2% D-Pinitol). Although the final dose of D-Pinitol taken by these subjects was **40% higher** than that used in the previous group administered with pure D-Pinitol alone, both half-life and C_{max} were very similar; demonstrating that **carbohydrates interfere with the absorption of D-Pinitol**, probably due to competition from glucose and fructose for the inositol transporter (57).

This study also describes the pharmacological effects of D-Pinitol on both glycaemia and the secretion of hormones related to glucose homeostasis in healthy fasting humans. Administration of 15 mg/kg D-Pinitol resulted in a **pharmacological profile very similar to that**

found in the previous preclinical rodent model, with a small **decrease in insulinaemia**, without affecting glycaemia, while **glucagon levels increased rapidly**. This metabolic profile was explained in the *in vivo* and *in vitro* preclinical models of the first study of this thesis by two mechanisms: a) a direct inhibitory action of D-Pinitol on insulin secretion in β -cells, through modulation of ERK1/2 signalling; and b) an inhibition of insulin secretion exerted by increased ghrelin. In the absence of experimental data on the actions of D-Pinitol in human pancreatic islets, the effect on ERK1/2 signalling cannot be confirmed; however, **an increase in plasma levels of acylated ghrelin** (active form) is observed 60 min after D-Pinitol ingestion. On the other hand, the surprising stability of blood glucose despite the reduction in insulin secretion and increases in glucagon, is also in line with the findings of the first study, which discusses the possibility that the fasting intake of D-Pinitol exerts an action on muscle to stimulate blood glucose uptake, causing a transient hypoglycaemia in the first few minutes after administration, which is rapidly compensated by the action of glucagon.

It has also been shown that D-Pinitol consumption in healthy fasting humans **did not result in a decrease in circulating FFA**. It can be interpreted that D-Pinitol supports the release of FFA through the actions of glucagon, as levels of this hormone were increased. This finding may have interesting therapeutic potential in **non-alcoholic steatohepatitis (NASH)**, where D-Pinitol consumption could reduce hepatic steatosis by reducing fatty acid deposition; some recently published data would support this hypothesis (58).

The fact that D-Pinitol administration resulted in increased ghrelin release, together with the known effects of inositols on the gonadal axis (59,60), led us to examine the impact of this compound on circulating levels of pituitary hormones. Surprisingly, D-Pinitol at the doses studied **only affected growth hormone (GH) secretion, decreasing it**, while circulating concentrations of PRL, TSH or gonadotropins (LH, FSH) remained unchanged. The decrease in GH was intriguing because an opposite profile was expected; on the one hand, increasing ghrelin, which is a secretagogue of GH, should increase its levels; on the other hand, decreasing insulin, which is an inhibitor of GH release from somatotroph cells (61–63), should also cause GH levels to increase. In this regard, some experimental data in animal models could explain this unexpected result (64), suggesting that D-Pinitol could exert a potent insulin-mimetic action in the hypothalamus, which could lead to a dysregulation of hypothalamic control of GH via growth hormone-releasing hormone (GHRH). Therefore, D-Pinitol, through its insulin-mimetic capacity in the hypothalamus, could have an inhibitory effect on pituitary GH secretion, although it is not yet known whether this stimulatory effect of D-Pinitol on hypothalamic insulin signalling occurs in humans.

Overall, this human study reaffirms that D-Pinitol consumption has a **protective/preventive effect on the endocrine pancreas**, as it helps to reduce the insulin secretion load and thus reduces one of the main factors contributing to pancreatic exhaustion. In addition, a **possible preventive role of D-Pinitol in the development of hepatic steatosis** is suggested, via a stimulatory effect on glucagon secretion, which should encourage lipolysis and the transfer of free fatty acids to the liver for further oxidation in the mitochondria. However, more research is still needed to fully elucidate this hypothetical therapeutic role of D-Pinitol intake.

It should also be emphasized that the number of subjects undergoing treatment was small, which could affect the assessment of certain endocrine effects. Nevertheless, the chosen sample size can be considered consistent with the objectives of the study, and sufficient to determine the pharmacokinetic parameters of oral administration of D-Pinitol, the main purpose of this research.

Third publication. "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"

The rationale of the third study is to test whether it is possible to enhance the normal physiological response to caloric sweetener intake, by boosting endogenous modulatory mechanisms that help both maintain weight and sustain energy expenditure. **Carob syrup** was used for this purpose, due to its simple and balanced composition in fructose, glucose and D-Pinitol, while maintaining sweet palatability and corresponding caloric value.

The data reveal that acute administration of carob syrup to healthy fasting humans, together with an increase in plasma D-Pinitol levels, produces a **smaller increase in blood glucose** compared to administration of glucose alone, with a **better glycemic index** and being a more effective sweetener for bringing blood glucose back to basal levels. These results show that the addition of D-Pinitol improves the body's handling of glucose, as well as the insulin response, as it was **shorter and less intense** (reducing the HOMA-IR index). Interestingly, the presence of fructose and glucose in the carob syrup **is not associated with a decrease in circulating free fatty acids**, which has been reported for both glucose and especially fructose (65), suggesting that **D-Pinitol slows the antilipolytic/prolipogenic actions of both monosaccharides**. Furthermore, plasma fructose concentrations after ingestion of carob syrup are time-limited, suggesting a relevant role of D-Pinitol in its regulation, since it should be noted that, compared to agave syrup (mainly fructose-based), the duration and intensity of the plasma fructose peak were much lower than expected with carob syrup.

Another curious result of carob syrup administration to humans, is that there is no increase in plasma ghrelin concentration, possibly due to the presence of glucose in the syrup, which may be inhibiting ghrelin secretion after an acute administration.

At this point, this third paper was supplemented by tests on a rat model. First, to confirm that the decrease in blood glucose excursion (incremental change) observed after carob syrup administration in humans (compared to administration of glucose alone) was not due to the different amount of glucose administered, the blood glucose of Wistar rats was analysed after administration of: A) pure glucose (2 g/kg), or B) a dose of carob syrup containing the same amount of glucose (2 g/kg). The data indicate that **the variation in blood glucose was substantially lower in the animals that received the syrup**, supporting the insulin-sensitising activity of D-Pinitol. In addition to these results, repeated administration of carob syrup for 8 days, improved glycaemia when the animals were subjected to a glucose tolerance test (compared to animals that only drank water for those 8 days).

In this part of the study with the Wistar rat model, the metabolic effects of **chronic** intake of carob syrup for 10 days were tested. At the same time, and in a complementary manner, a parallel trial was also carried out in which pure D-Pinitol dissolved in the drink (100 mg/Kg/day) was administered for those 10 days. At the end of the procedure, neither chronic treatment with pure D-Pinitol nor with carob syrup was observed to reduce plasma insulin concentration, although plasma ghrelin levels increased in the syrup-treated group of animals. Furthermore, even no significant increase in blood glucagon levels was detected, both chronic treatments (pure D-Pinitol and carob syrup) showed a tendency to increase these levels. In fact, **a tendency (although not significant) to increase the glucagon/insulin ratio** was again observed, an effect already described in the first two studies of this thesis. In other words, chronically administered D-Pinitol, both in its pure form and as part of syrup, tends to maintain a "pro-glucagon" metabolic character.

Of particular interest was that **fat and glycogen stores in the liver decreased** after chronic treatment with carob syrup in Wistar rats. One possible explanation is that ingestion of

D-Pinitol in the syrup redirects liver metabolism towards glucose export and lipid oxidation, which is related to the function of glucagon. Indeed, this physiological effect of glucagon has been incorporated into the latest anti-obesity/anti-aesteatosis drugs such as glucagon/GIP/GLP-1 triple agonists (Retatrutide). In our experiments, this idea was supported by the results in which an enhancement of gene expression of enzymes involved in **gluconeogenesis**, such as *Pck1* and *G6pc*, was observed, as well as an intensification of the **fatty acid β -oxidation pathway**, reflected in the increased gene expression of *Acox-1* and *Cpt1*, in addition to oxidative phosphorylation in mitochondria manifested by the increased expression of *Cox4i1*. Notably, with both chronic syrup and pure D-Pinitol treatments, **plasma urea concentrations increased, but not uric acid ones**, also suggesting activation of the glucagon pathway.

These effects on lipid oxidation following chronic treatment with carob syrup in Wistar rats were not coupled with a plasma export of β -hydroxybutyrate, nor led to the production of ketones, indicating that this increase in fatty acid oxidation was not used to generate ketone bodies as glucose suppliers. This was also not the case in humans, where plasma levels of β -hydroxybutyrate and ketone bodies did not increase after acute intake of carob syrup. In addition, no evidence of oxidative stress was found, as liver malondialdehyde, a marker of lipid peroxidation, did not increase after consumption of carob syrup. Therefore, the overall profile of carob syrup is that of a **safe sweetener in the short/medium term**, which supports the actions of glucagon and is also able to prevent the undesirable effects of fructose, strongly related to hepatic steatosis. Of course, studies involving longer-term exposure to carob syrup (4 to 8 months) are needed to fully ensure the absence of toxicity associated with the fructose present in its composition.

Finally, another aspect to note is that after 10 days of treatment with carob syrup dissolved in the drink of Wistar rats, no activation of the glycogen synthesis pathway in the liver was observed, but a tendency to inhibit GSK-3 β activity in the hypothalamus; and, above all, a clear decrease in the phosphorylation of the tau protein in the hippocampus was observed. The possibility of the syrup exhibiting neuroprotective actions in a tauopathy scenario needs to be studied further, but it is clear that the profile of results obtained in the brain is very similar to that described in experimental conditions in which D-Pinitol was administered alone (64,66).

In general, the above results suggest that the D-Pinitol present in carob syrup is bioactive and that the presence of glucose and fructose does not affect its pharmacological properties.

Although this thesis opens up very promising possibilities for the use of D-Pinitol as a drug and carob syrup as a functional food, there are still unexplored aspects regarding its mechanisms of action and effects. It is therefore important to further study the impact of D-Pinitol in different scenarios, to describe in more depth how it can help to improve the metabolic profile of sweeteners, and of course, to test its long-term effects.

12.2. Conclusions

The overall aims of this work were to characterize the pharmacokinetics of D-Pinitol, to verify its safety, and to assess its impact on glycaemic control and insulin response. All this to assess the use of this inositol, either as a pure extract or as part of a natural syrup, as an alternative natural sweetener for biosafe consumption and with benefits for glucose and lipid metabolism.

The following conclusions can be drawn from the findings of this thesis:

- I. Oral administration of D-Pinitol (pure or as part of a natural carob syrup) shows that it is a **biosafe product**, exhibiting **rapid absorption** in rats, while this is slower in humans. It is also shown that the presence of carbohydrates partially reduces the absorption of D-Pinitol.
- II. Acute administration of D-Pinitol in a fasting state, both in rats and in humans, **reduces circulating insulin levels** without affecting glycemia, which favors a decrease in the HOMA-IR index. This fact is related to two observations: on one hand, the increase in plasma ghrelin levels, and on the other, the direct inhibition of insulin secretion in a β -cell model. These effects place D-Pinitol as a natural compound of great **pancreas-protective** value.
- III. Acute administration of D-Pinitol in a fasting state, both in rats and in humans, increases plasma glucagon levels, which, along with the decrease in insulinemia, **increases the glucagon/insulin ratio**. In rats, this effect is associated with **reduced hepatic glycolysis**, as well as a **hypoactive** state of the insulin receptor in the liver.
- IV. Acute administration of carob syrup (which contains glucose, fructose, and D-Pinitol) generates a **moderately elevated glycemic index** in humans. However, the increase in circulating insulin is **less intense and shorter** in duration compared to the intake of pure glucose, this causes a raise in the glucagon/insulin ratio. In rats, the syrup promotes a faster uptake of circulating glucose than pure glucose intake.
- V. Chronic administration of carob syrup in rats **reduces fat and glycogen content in the liver**, probably due to a redirection of hepatic metabolism towards glucose export and lipid oxidation, which is in line with a **greater action of glucagon** in this tissue.
- VI. Chronic administration of carob syrup in rats shows some impact on brain areas. The insulin signalling pathway is modestly activated in the hypothalamus, which could have implications for the control of homeostasis and metabolism. However, there is no such activation in the hippocampus, but a clear **decrease in tau protein phosphorylation** is observed in this region, which could have significant repercussions for tauopathies.
- VII. Carob syrup is a product that, while maintaining a sweet palatability and its corresponding caloric value, **improves carbohydrate and lipid metabolism**. These properties are attributed to the presence of **D-Pinitol in its composition as a bioactive and safe element**.

12.3. Epilogue

The data presented in this thesis indicate that D-Pinitol exhibits very specific actions beyond its established role taking part of glycans, which serve as mediators of insulin signalling. This inositol is able to reduce insulin secretion, likely through direct action on β -cells as well as indirectly by increasing ghrelin levels. These effects may protect the endocrine pancreas by alleviating the high insulin demand placed on pancreatic islets under conditions of insulin resistance. This property makes D-Pinitol, and by extension, carob syrup, potentially useful dietary supplements in a prediabetic scenario (such as obesity, ageing, etc.), where the pancreas is depleted due to an overproduction of inefficient insulin.

The finding of the ability of D-Pinitol to induce a transient increase in circulating ghrelin levels opens new perspectives on the actions and use of this inositol in pathological situations of sarcopenia or weight loss due to cachexia or anorexia.

The studies in fasting healthy humans in this thesis corroborate that, when administered pure, D-Pinitol is rapidly incorporated into the bloodstream, with a prolonged

period of absorption and a long half-life. Its administration together with carbohydrates results in a partial reduction in its absorption, suggesting that, perhaps, the maximum effects of D-Pinitol are achieved by administering it in the absence of other foods.

As discussed above, D-Pinitol is able to reduce insulinemia while maintaining glycaemia, and it achieves this through coordinated actions on glucagon and ghrelin secretion. This pharmacological profile suggests that the use of D-Pinitol as a dietary supplement could be a good strategy to help fight the insulin resistance/T2DM epidemics that have spread across most developed countries.

In addition, the use of a natural carob syrup containing mainly glucose, fructose and D-Pinitol in its composition, resulted in an improvement in the glycemic index (compared to that observed when glucose alone was administered), as well as presenting a safe profile. This reduction in the glycemic index was probably due to the presence of D-Pinitol in its composition, since, as when D-Pinitol alone was administered, a lower insulin response and an increase in glucagon activity were again detected.

The results presented show evidence that the administration of carob syrup has advantages over other syrups containing high amounts of fructose, such as agave syrup, which, although they do not generate blood glucose and insulin peaks, do produce an overload of fructose that can be converted to fat in the liver, contributing to the development of hepatic steatosis, increases in LDL and cholesterol blood levels, visceral fat, insulin resistance, metabolic syndrome and T2DM.

Ultimately, carob syrup is a potent natural sweetener, so the quantities required as a sweetener are minimal, with the added advantages of having a low caloric value and a beneficial impact on glucose metabolism. But more research is needed to see if the D-Pinitol in the syrup can counteract the undesirable effects of a long-term fructose administration, and to document whether the use of this "functional sweetener" is useful in the context of obesity and diabetes.



13. ANEXOS

13.1. Listado de publicaciones que avalan esta tesis doctoral

- **Navarro JA**, Decara J, Medina-Vera D, Tovar R, Suarez J, Pavón J, Serrano A, Vida M, Gutierrez-Adan A, Sanjuan C, Baixeras E, Rodríguez De Fonseca F. 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 Jul 8;12(7):2030. doi: 10.3390/nu12072030. PMID: 32650579; PMCID: PMC7400942.
- **Navarro JA**, Díaz C, Decara J, Medina-Vera D, Lopez-Gambero AJ, Suarez J, Pavón FJ, Serrano A, Vargas A, Gavito AL, Porras-Perales O, Aranda J, Vicente F, Sanjuan C, Baixeras E, Rodríguez De Fonseca F. Pharmacokinetics and Endocrine Effects of an Oral Dose of D-Pinitol in Human Fasting Healthy Volunteers. *Nutrients*. 2022 Oct 1;14(19):4094. doi: 10.3390/nu14194094. PMID: 36235746; PMCID: PMC9572189.
- **Navarro JA**, Decara J, Medina-Vera D, Tovar R, Lopez-Gambero AJ, Suarez J, Pavón FJ, Serrano A, de Ceglia M, Sanjuan C, Baltasar YA, Baixeras E, Rodríguez de Fonseca F. 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 Jul 30;14(8):1594. doi: 10.3390/pharmaceutics14081594. PMID: 36015220; PMCID: PMC9416495.

13.2. Listado de otras publicaciones realizadas a lo largo de esta tesis doctoral

- Decara J, Serrano A, Pavón FJ, Rivera P, Arco R, Gavito A, Vargas A, **Navarro JA**, Tovar R, Lopez-Gambero AJ, Martínez A, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F, Baixeras E. The adiponectin promoter activator NP-1 induces high levels of circulating TNF α and weight loss in obese (fa/fa) Zucker rats. *Sci Rep*. 2018 Jun 29;8(1):9858. doi: 10.1038/s41598-018-27871-7. PMID: 29959379; PMCID: PMC6026175.
- Rivera P, Tovar R, Ramírez-López MT, **Navarro JA**, Vargas A, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F. Sex-Specific Anxiety and Prefrontal Cortex Glutamatergic Dysregulation Are Long-Term Consequences of Pre-and Postnatal Exposure to Hypercaloric Diet in a Rat Model. *Nutrients*. 2020 Jun 19;12(6):1829. doi: 10.3390/nu12061829. PMID: 32575416; PMCID: PMC7353464.
- Pericuesta E, Laguna-Barraza R, Ramos-Ibeas P, Gutierrez-Arroyo JL, **Navarro JA**, Vera K, Sanjuan C, Baixeras E, Rodríguez de Fonseca F, Gutierrez-Adan A. D-Chiro-Inositol Treatment Affects Oocyte and Embryo Quality and Improves Glucose Intolerance in Both Aged Mice and Mouse Models of Polycystic Ovarian Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 22;21(17):6049. doi: 10.3390/ijms21176049. PMID: 32842637; PMCID: PMC7504697.
- Medina-Vera D, Rosell-Valle C, López-Gambero AJ, **Navarro JA**, Zambrana-Infantes EN, Rivera P, Santín LJ, Suarez J, Rodríguez de Fonseca F. Imbalance of Endocannabinoid/Lysophosphatidylinositol Receptors Marks the Severity of Alzheimer's Disease in a Preclinical Model: A Therapeutic Opportunity. *Biology (Basel)*. 2020 Nov 5;9(11):377. doi: 10.3390/biology9110377. PMID: 33167441; PMCID: PMC7694492.
- López-Gambero AJ, Rosell-Valle C, Medina-Vera D, **Navarro JA**, Vargas A, Rivera P, Sanjuan C, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. A Negative Energy Balance Is Associated

with Metabolic Dysfunctions in the Hypothalamus of a Humanized Preclinical Model of Alzheimer's Disease, the 5XFAD Mouse. *Int J Mol Sci.* 2021 May 20;22(10):5365. doi: 10.3390/ijms22105365. PMID: 34065168; PMCID: PMC8161294.

- Medina-Vera D, **Navarro JA**, Tovar R, Rosell-Valle C, Gutiérrez-Adán A, Ledesma JC, Sanjuan C, Pavón FJ, Baixeras E, Rodríguez de Fonseca F, Decara J. Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway in Rat Hypothalamus Induced by an Acute Oral Administration of D-Pinitol. *Nutrients.* 2021 Jun 30;13(7):2268. doi: 10.3390/nu13072268. PMID: 34209137; PMCID: PMC8308282.
- López-Gambero AJ, Pacheco-Sánchez B, Rosell-Valle C, Medina-Vera D, **Navarro JA**, Fernández-Arjona MDM, de Ceglia M, Sanjuan C, Simon V, Cota D, Rivera P, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. Dietary administration of D-chiro-inositol attenuates sex-specific metabolic imbalances in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother.* 2022 Jun;150:112994. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112994. Epub 2022 Apr 26. PMID: 35483188.
- Medina-Vera D, **Navarro JA**, Rivera P, Rosell-Valle C, Gutiérrez-Adán A, Sanjuan C, López-Gambero AJ, Tovar R, Suárez J, Pavón FJ, Baixeras E, Decara J, Rodríguez de Fonseca F. d-Pinitol promotes tau dephosphorylation through a cyclin-dependent kinase 5 regulation mechanism: A new potential approach for tauopathies? *Br J Pharmacol.* 2022 Oct;179(19):4655-4672. doi: 10.1111/bph.15907. Epub 2022 Jul 18. PMID: 35760415; PMCID: PMC9544772.
- Medina-Vera D, López-Gambero AJ, **Navarro JA**, Sanjuan C, Baixeras E, Decara J, Rodríguez de Fonseca F. Novel insights into D-Pinitol based therapies: a link between tau hyperphosphorylation and insulin resistance. *Neural Regen Res.* 2024 Feb;19(2):289-295. doi: 10.4103/1673-5374.379015. PMID: 37488880; PMCID: PMC10503604.
- Fernández-Arjona MDM, **Navarro JA**, López-Gambero AJ, de Ceglia M, Rodríguez M, Rubio L, Rodríguez de Fonseca F, Barrios V, Chowen JA, Argente J, Rivera P, Suárez J. Sex-based differences in growth-related IGF1 signaling in response to PAPP-A2 deficiency: comparative effects of rhGH, rhIGF1 and rhPAPP-A2 treatments. *Biol Sex Differ.* 2024 Apr 8;15(1):34. doi: 10.1186/s13293-024-00603-5. PMID: 38589872; PMCID: PMC11000399.

13.3. Listado de patentes publicadas a lo largo de esta tesis doctoral

- Rodríguez De Fonseca F, **Navarro JA**, Baixeras E, Decara JM, Medina D, Lopez-Gambero AJ, et al. Composition and methods for enhancing or promoting the secretion of ghrelin to promote a healthy metabolic aging. European patent EP 3789018(A1), 2021.



14. BIBLIOGRAFÍA

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th edn. Brussels, Belgium: 2021. Available at: <https://www.diabetesatlas.org>.
2. World Obesity Federation, World Obesity Atlas 2023. <https://data.worldobesity.org/publications/?cat=19>.
3. Kerner W, Brückel J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014 Jul;122(7):384–6.
4. Schmidt AM. Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Jan;38(1):e1–8.
5. Newsholme P, Krause M. Nutritional regulation of insulin secretion: implications for diabetes. *Clin Biochem Rev*. 2012 May;33(2):35–47.
6. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet*. 2012; 379(9833): 2279-90. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60283-9.
7. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018; 41 (Suppl 1): S13–27.
8. Burgos-Morón E, Abad-Jiménez Z, Marañón AM de, Iannantuoni F, Escribano-López I, López-Domènech S, et al. Relationship Between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. *J Clin Med*. 2019 Sep;8(9).
9. Cerf ME. Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:37.
10. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018; 14(2): 88-98. doi: 10.1038/nrendo.2017.151.
11. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med*. 2001; 345(11): 790-7. doi: 10.1056/NEJMoa010492.
12. Sinha R, Dufour S, Petersen KF, LeBon V, Enoksson S, Ma YZ, et al. Assessment of skeletal muscle triglyceride content by (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents: relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity. *Diabetes*. 2002 Apr;51(4):1022–7.
13. Rogge MM, Gautam B. Biology of obesity and weight regain: Implications for clinical practice. *J Am Assoc Nurse Pract*. 2017; 29(S1): S15-S29. doi: 10.1002/2327-6924.12504.
14. Malone JL, Hansen BC. Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite? *Pediatr Diabetes*. 2019; 20(1): 5-9. doi: 10.1111/pedi.12787.
15. Kroger M, Meister K, Kava R. Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. 2006; 5(2): 35-47. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00081.x>.
16. Azad MB, Abou-Setta AM, Chauhan BF, Rabbani R, Lys J, Copstein L, et al. Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of

randomized controlled trials and prospective cohort studies. *CMAJ*. 2017 Jul;189(28):E929–39.

17. Swithers SE. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends Endocrinol Metab*. 2013; 24(9): 431-41. doi: 10.1016/j.tem.2013.05.005.
18. Swithers SE, Shearer J. Obesity: Sweetener associated with increased adiposity in young adults. *Nat Rev Endocrinol*. 2017; 13(8): 443-444. doi: 10.1038/nrendo.2017.71.
19. Schiano C, Grimaldi V, Scognamiglio M, Costa D, Soricelli A, Nicoletti GF, et al. Soft drinks and sweeteners intake: Possible contribution to the development of metabolic syndrome and cardiovascular diseases. Beneficial or detrimental action of alternative sweeteners? *Food Res Int*. 2021 Apr;142:110220.
20. Czarnecka K, Pilarz A, Rogut A, Maj P, Szymańska J, Olejnik Ł, et al. Aspartame-True or False? Narrative Review of Safety Analysis of General Use in Products. *Nutrients*. 2021 Jun;13(6).
21. Pang MD, Goossens GH, Blaak EE. The Impact of Artificial Sweeteners on Body Weight Control and Glucose Homeostasis. *Front Nutr*. 2020;7:598340.
22. Greenwood DC, Threapleton DE, Evans CEL, Cleghorn CL, Nykjaer C, Woodhead C, et al. Association between sugar-sweetened and artificially sweetened soft drinks and type 2 diabetes: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Br J Nutr*. 2014 Sep;112(5):725–34.
23. Debras C, Chazelas E, Sellem L, Porcher R, Druet-Pecollo N, Esseddik Y, et al. Artificial sweeteners and risk of cardiovascular diseases: results from the prospective NutriNet-Santé cohort. *BMJ*. 2022; 378: e071204. doi: 10.1136/bmj-2022-071204.
24. Kim Y, Je Y. Prospective association of sugar-sweetened and artificially sweetened beverage intake with risk of hypertension. *Arch Cardiovasc Dis*. 2016; 109(4): 242-53. doi: 10.1016/j.acvd.2015.10.005.
25. Basson AR, Rodriguez-Palacios A, Cominelli F. Artificial Sweeteners: History and New Concepts on Inflammation. *Front Nutr*. 2021; 8: 746247. doi: 10.3389/fnut.2021.746247.
26. Risdon S, Meyer G, Marziou A, Riva C, Roustit M, Walther G. Artificial sweeteners impair endothelial vascular reactivity: Preliminary results in rodents. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2020; 30(5): 843-846. doi: 10.1016/j.numecd.2020.01.014.
27. Jang W, Jeoung NH, Cho KH. Modified apolipoprotein (apo) A-I by artificial sweetener causes severe premature cellular senescence and atherosclerosis with impairment of functional and structural properties of apoA-I in lipid-free and lipid-bound state. *Mol Cells*. 2011; 31(5): 461-70.
28. Farup PG, Lydersen S, Valeur J. Are Nonnutritive Sweeteners Obesogenic? Associations between Diet, Faecal Microbiota, and Short-Chain Fatty Acids in Morbidly Obese Subjects. *J Obes*. 2019; 2019: 4608315. doi: 10.1155/2019/4608315.

29. Bian X, Tu P, Chi L, Gao B, Ru H, Lu K. Saccharin induced liver inflammation in mice by altering the gut microbiota and its metabolic functions. *Food Chem Toxicol.* 2017; 107(Pt B): 530-539. doi: 10.1016/j.fct.2017.04.045.
30. Bian X, Chi L, Gao B, Tu P, Ru H, Lu K. The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice. *PLoS One.* 2017; 12(6): e0178426. doi: 10.1371/journal.pone.0178426.
31. López-Gambero AJ, Sanjuan C, Serrano-Castro PJ, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F. The Biomedical Uses of Inositols: A Nutraceutical Approach to Metabolic Dysfunction in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines.* 2020 Aug;8(9).
32. Thomas MP, Mills SJ, Potter BV. The 'Other' Inositols and Their Phosphates: Synthesis, Biology, and Medicine (with Recent Advances in myo-Inositol Chemistry). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016; 55(5): 1614-50. doi: 10.1002/anie.201502227.
33. Goodhart RS, Shils M. *Modern Nutrition in Health and Disease*; Lea & Febiger: Philadelphia, PA, USA, 1980.
34. Clements RS Jr, Darnell B. Myo-inositol content of common foods: development of a high-myo-inositol diet. *Am J Clin Nutr.* 1980; 33(9): 1954-67. doi: 10.1093/ajcn/33.9.1954.
35. Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B. Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.* 2001; 20(16): 4467-77. doi: 10.1093/emboj/20.16.4467.
36. Lerner J, Brautigan DL, Thorner MO. D-chiro-inositol glycans in insulin signaling and insulin resistance. *Molecular Medicine.* 2010;16(11-12):543-51.
37. Croze ML, Soulage CO. Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie.* 2013; 95(10): 1811-27. doi: 10.1016/j.biochi.2013.05.011.
38. Yap A, Nishiumi S, Yoshida K, Ashida H. Rat L6 myotubes as an in vitro model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. *Cytotechnology.* 2007; 55(2-3): 103-8. doi: 10.1007/s10616-007-9107-y.
39. Maeba R, Hara H, Ishikawa H, Hayashi S, Yoshimura N, Kusano J, et al. Myo-inositol treatment increases serum plasmalogens and decreases small dense LDL, particularly in hyperlipidemic subjects with metabolic syndrome. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2008 Jun;54(3):196-202.
40. Bizzarri M, Dinicola S, Cucina A. Modulation of both Insulin Resistance and Cancer Growth by Inositol. *Curr Pharm Des.* 2017; 23(34): 5200-5210. doi: 10.2174/1381612823666170830123634.
41. Sánchez-Hidalgo M, León-González AJ, Gálvez-Peralta M, González-Mauraza NH, Martín-Cordero C. D-Pinitol: a cyclitol with versatile biological and pharmacological activities. *Phytochem Rev.* 2021; 20: 211-224. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09677-6>. Correction: *Phytochem Rev.* 2021; 20: 225-226. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09732-2>.

42. Negishi O, Mun'im A, Negishi Y. Content of methylated inositols in familiar edible plants. *J Agric Food Chem.* 2015; 63(10): 2683-8. doi: 10.1021/jf5041367.
43. Phillips DV, Dougherty DE, Smith AE. Cyclitols in soybean. *J Agric Food Chem.* 1982; 30(3): 456-8. doi: 10.1021/jf00111a011.
44. Tetik N, Turhan I, Oziyici HR, Karhan M. Determination of D-pinitol in carob syrup. *Int J Food Sci Nutr.* 2011; 62(6): 572-6. doi: 10.3109/09637486.2011.560564.
45. Bates SH, Jones RB, Bailey CJ. Insulin-like effect of pinitol. *Br J Pharmacol.* 2000;130(8):1944–8.
46. Kim JI, Kim JC, Kang MJ, Lee MS, Kim JJ, Cha IJ. Effects of pinitol isolated from soybeans on glycaemic control and cardiovascular risk factors in Korean patients with type II diabetes mellitus: a randomized controlled study. *Eur J Clin Nutr.* 2005 Mar;59(3):456–8.
47. Hernández-Mijares A, Bañuls C, Peris JE, Monzó N, Jover A, Bellod L, et al. A single acute dose of pinitol from a naturally-occurring food ingredient decreases hyperglycaemia and circulating insulin levels in healthy subjects. *Food Chem.* 2013;141(2):1267–72.
48. Bañuls C, Rovira-Llopis S, Falcón R, Veses S, Monzó N, Víctor VM, et al. Chronic consumption of an inositol-enriched carob extract improves postprandial glycaemia and insulin sensitivity in healthy subjects: A randomized controlled trial. *Clin Nutr.* 2016 Jun;35(3):600–7.
49. Davis A, Christiansen M, Horowitz JF, Klein S, Hellerstein MK, Ostlund RE Jr. Effect of pinitol treatment on insulin action in subjects with insulin resistance. *Diabetes Care.* 2000; 23(7): 1000-5. doi: 10.2337/diacare.23.7.1000.
50. Stull AJ, Wood K V., Thyfault JP, Campbell WW. Effects of acute pinitol supplementation on plasma pinitol concentration, whole body glucose tolerance, and activation of the skeletal muscle insulin receptor in older humans. *Horm Metab Res.* 2009;41(5):381–6.
51. Campbell WW, Haub MD, Fluckey JD, Ostlund RE, Thyfault JP, Morse-Carrithers H, et al. Pinitol Supplementation Does Not Affect Insulin-Mediated Glucose Metabolism and Muscle Insulin Receptor Content and Phosphorylation in Older Humans. *J Nutr.* 2004;134(11):2998–3003.
52. Dang NT, Mukai R, Yoshida KI, Ashida H. D-pinitol and myo-inositol stimulate translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle of C57BL/6 mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010;74(5):1062–7.
53. 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(26):6019–26.
54. Colombo M, Gregersen S, Xiao J, Hermansen K. Effects of ghrelin and other neuropeptides (CART, MCH, orexin A and B, and GLP-1) on the release of insulin from isolated rat islets. *Pancreas.* 2003;27(2):161–6.
55. Lindqvist A, Shcherbina L, Prasad RB, Miskelly MG, Abels M, Lopes JAM, et al. Ghrelin suppresses insulin secretion in human islets and type 2 diabetes patients have diminished islet ghrelin cell number and lower plasma ghrelin levels. *Mol Cell*

Endocrinol [Internet]. 2020;110835. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110835>

56. Pratt EPS, Salyer AE, Guerra ML, Hockerman GH. Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels and Ca²⁺-induced Ca²⁺ release regulate cAMP accumulation and Epac1-dependent ERK 1/2 activation in INS-1 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2016 Jan;419:60–71.
57. Lin X, Ma L, Fitzgerald RL, Ostlund RE Jr. Human sodium/inositol cotransporter 2 (SMIT2) transports inositols but not glucose in L6 cells. *Arch Biochem Biophys*. 2009; 481(2): 197-201. doi: 10.1016/j.abb.2008.11.008.
58. Lee E, Lim Y, Kwon SW, Kwon O. Pinitol consumption improves liver health status by reducing oxidative stress and fatty acid accumulation in subjects with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Nutr Biochem*. 2019 Jun;68:33–41.
59. Laganà AS, Vitagliano A, Noventa M, Ambrosini G, D’Anna R. Myo-inositol supplementation reduces the amount of gonadotropins and length of ovarian stimulation in women undergoing IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Gynecol Obstet*. 2018 Oct;298(4):675–84.
60. Sacchi S, Marinaro F, Tondelli D, Lui J, Xella S, Marsella T, et al. Modulation of gonadotrophin induced steroidogenic enzymes in granulosa cells by d-chiroinositol. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016 Aug;14(1):52.
61. Qiu H, Yang JK, Chen C. Influence of insulin on growth hormone secretion, level and growth hormone signalling. *Sheng Li Xue Bao*. 2017 Oct;69(5):541–56.
62. Yamashita S, Melmed S. Effects of insulin on rat anterior pituitary cells. Inhibition of growth hormone secretion and mRNA levels. *Diabetes*. 1986 Apr;35(4):440–7.
63. Melmed S. Insulin suppresses growth hormone secretion by rat pituitary cells. *J Clin Invest*. 1984 May;73(5):1425–33.
64. Medina-Vera D, Navarro JA, Tovar R, Rosell-Valle C, Gutiérrez-Adán A, Ledesma JC, et al. Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway in Rat Hypothalamus Induced by an Acute Oral Administration of D-Pinitol. *Nutrients* [Internet]. 2021;13(7). Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/7/2268>
65. Tappy L, Randin JP, Felber JP, Chiolerio R, Simonson DC, Jequier E, et al. Comparison of thermogenic effect of fructose and glucose in normal humans. *Am J Physiol*. 1986 Jun;250(6 Pt 1):E718-24.
66. Medina-Vera D, Navarro JA, Rivera P, Rosell-Valle C, Gutiérrez-Adán A, Sanjuan C, 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 Oct;179(19):4655–72.
67. Rudnicka E, Napierała P, Podfigurna A, Męczekalski B, Smolarczyk R, Grymowicz M. The World Health Organization (WHO) approach to healthy ageing. *Maturitas*. 2020; 139: 6-11. doi: 10.1016/j.maturitas.2020.05.018.

68. United Nations Human Settlements Programme (UN-Habitat). World Cities Report 2022. Nairobi, Kenya: 2022. Available at: https://unhabitat.org/sites/default/files/2022/06/wcr_2022.pdf.
69. Guthold R, Stevens GA, Riley LM, Bull FC. Worldwide trends in insufficient physical activity from 2001 to 2016: a pooled analysis of 358 population-based surveys with 1·9 million participants. *Lancet Glob Health*. 2018; 6(10): e1077-e1086.
70. Basu S, Yoffe P, Hills N, Lustig RH. The relationship of sugar to population-level diabetes prevalence: an econometric analysis of repeated cross-sectional data. *PLoS One*. 2013; 8(2): e57873. doi: 10.1371/journal.pone.0057873.
71. Lawrence MC. Understanding insulin and its receptor from their three-dimensional structures. *Mol Metab*. 2021 Oct;52:101255.
72. Persaud SJ, Liu B, Jones PM. Functional analysis of human islets of Langerhans maintained in culture. *Methods Mol Biol*. 2012;806:55–71.
73. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol*. 2018 Jul;217(7):2273–89.
74. Pertusa JAG, León-Quinto T, Berná G, Tejedo JR, Hmadcha A, Bedoya FJ, et al. Zn²⁺ chelation by serum albumin improves hexameric Zn²⁺-insulin dissociation into monomers after exocytosis. *PLoS One*. 2017;12(11):e0187547.
75. Park SY, Gautier JF, Chon S. Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human. *Diabetes Metab J*. 2021 Sep;45(5):641–54.
76. Niswender KD. Basal insulin: physiology, pharmacology, and clinical implications. *Postgrad Med*. 2011 Jul;123(4):17–26.
77. Misler S, Gillis KD. Modes of exocytosis and electrogenesis underlying canine biphasic insulin secretion. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 Jan;4(2):669–76.
78. Raka F, Farr S, Kelly J, Stoianov A, Adeli K. Metabolic control via nutrient-sensing mechanisms: role of taste receptors and the gut-brain neuroendocrine axis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019 Oct;317(4):E559–72.
79. McClenaghan NH, Barnett CR, Flatt PR. Na⁺ cotransport by metabolizable and nonmetabolizable amino acids stimulates a glucose-regulated insulin-secretory response. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Aug;249(2):299–303.
80. Sener A, Best LC, Yates AP, Kadiata MM, Olivares E, Louchami K, et al. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release: comparison between the cationic amino acid and its methyl ester. *Endocrine*. 2000 Dec;13(3):329–40.
81. Rodriguez-Diaz R, Dando R, Jacques-Silva MC, Fachado A, Molina J, Abdulreda MH, et al. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nat Med*. 2011 Jun;17(7):888–92.
82. Zhu L, Rossi M, Doliba NM, Wess J. Beta-cell M(3) muscarinic acetylcholine receptors as potential targets for novel antidiabetic drugs. *Int Immunopharmacol*. 2020 Apr;81:106267.

83. Denley A, Wallace JC, Cosgrove LJ, Forbes BE. The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Horm Metab Res.* 2003;35(11–12):778–85.
84. Escribano O, Beneit N, Rubio-Longás C, López-Pastor AR, Gómez-Hernández A. The Role of Insulin Receptor Isoforms in Diabetes and Its Metabolic and Vascular Complications. *J Diabetes Res.* 2017;2017:1403206.
85. Westermeier F, Sáez T, Arroyo P, Toledo F, Gutiérrez J, Sanhueza C, et al. Insulin receptor isoforms: an integrated view focused on gestational diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016 May;32(4):350–65.
86. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Jan;19(1):31–44.
87. Mendivil Anaya CO, Sierra Ariza ID. ACCIÓN INSULÍNICA Y RESISTENCIA A LA INSULINA: ASPECTOS MOLECULARES. Vol. 53, *Revista de la Facultad de Medicina.* scieloco; 2005. p. 235–43.
88. Kleinridders A, Ferris HA, Cai W, Kahn CR. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes.* 2014 Jul;63(7):2232–43.
89. Makhijani P, Basso PJ, Chan YT, Chen N, Baechle J, Khan S, et al. Regulation of the immune system by the insulin receptor in health and disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2023;14. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2023.1128622>
90. Boucher J, Kleinridders A, Ronald Kahn C. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(1).
91. Olivares Reyes JA, Arellano Plancarte A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica.* 2008; 27(1): 9-18.
92. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol.* 2002; 12(2): 65-71. doi: 10.1016/s0962-8924(01)02207-3.
93. Lizcano JM, Alessi DR. The insulin signalling pathway. *Curr Biol.* 2002; 12(7): R236-8. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00777-7.
94. Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang HY, Ahima RS, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nat Rev Neurol.* 2018; 14(3): 168-181. doi: 10.1038/nrneurol.2017.185.
95. Tripolino C, Ciaffi J, Pucino V, Ruscitti P, van Leeuwen N, Borghi C, et al. Insulin Signaling in Arthritis. *Front Immunol.* 2021;12:672519.
96. Kurauti MA, Soares GM, Marmentini C, Bronczek GA, Branco RCS, Boschero AC. Insulin and aging. *Vitam Horm.* 2021;115:185–219.
97. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther.* 2015 Apr;148:114–31.
98. Hong M, Lee VM. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem.* 1997 Aug;272(31):19547–53.

99. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011 Feb;13(2):132–41.
100. Chypre M, Zaidi N, Smans K. ATP-citrate lyase: a mini-review. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 May;422(1):1–4.
101. Zhou Y, Liu F. Coordination of the AMPK, Akt, mTOR, and p53 Pathways under Glucose Starvation. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov;23(23).
102. Foretz M, Even PC, Viollet B. AMPK Activation Reduces Hepatic Lipid Content by Increasing Fat Oxidation In Vivo. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep;19(9).
103. Fang C, Pan J, Qu N, Lei Y, Han J, Zhang J, et al. The AMPK pathway in fatty liver disease. *Front Physiol.* 2022;13:970292.
104. Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, et al. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem.* 2000 Apr;275(15):10761–6.
105. Webb AE, Brunet A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci.* 2014 Apr;39(4):159–69.
106. Unterman TG. Regulation of Hepatic Glucose Metabolism by FoxO Proteins, an Integrated Approach. *Curr Top Dev Biol.* 2018;127:119–47.
107. Du S, Zheng H. Role of FoxO transcription factors in aging and age-related metabolic and neurodegenerative diseases. *Cell Biosci.* 2021 Nov;11(1):188.
108. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, et al. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging.* 2021 Aug;1(8):634–50.
109. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Insulin/IGF-1 signaling promotes immunosuppression via the STAT3 pathway: impact on the aging process and age-related diseases. *Inflamm Res.* 2021 Dec;70(10–12):1043–61.
110. Beale EG. Insulin signaling and insulin resistance. *J Investig Med.* 2013 Jan;61(1):11–4.
111. Lebovitz HE. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109 Suppl:S135–48.
112. Nitin S. HbA1c and factors other than diabetes mellitus affecting it. *Singapore Med J.* 2010 Aug;51(8):616–22.
113. World Health Organization IDF. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva: World Health Organization; 2006. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/43588>.
114. Bergman M, Manco M, Sesti G, Dankner R, Pareek M, Jagannathan R, et al. Petition to replace current OGTT criteria for diagnosing prediabetes with the 1-hour post-load plasma glucose ≥ 155 mg/dl (8.6 mmol/L). *Diabetes Res Clin Pract.* 2018; 146:18–33.
115. Sies H, Jones DP. Oxidative stress. *Encyclopedia of stress.* Eds. Fink G. 2007; 45–48.
116. Piconi L, Quagliaro L, Ceriello A. Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med.* 2003 Sep;41(9):1144–9.

117. Rebolledo OR, Actis Dato SM. Postprandial hyperglycemia and hyperlipidemia-generated glycoxidative stress: its contribution to the pathogenesis of diabetes complications. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2005;9(4):191–208.
118. Srikanth KK, Orrick JA. Biochemistry, Polyol Or Sorbitol Pathways. [Updated 2022 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK576381/>.
119. Saeedi Borujeni MJ, Esfandiary E, Baradaran A, Valiani A, Ghanadian M, Codoñer-Franch P, et al. Molecular aspects of pancreatic β -cell dysfunction: Oxidative stress, microRNA, and long noncoding RNA. *J Cell Physiol*. 2019 Jun;234(6):8411–25.
120. Calderón JV, Muñoz EG, Quintanar MA. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev. educ. bioquím.* 2013; 32(2): 53-66. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952013000200002&lng=es.
121. González P, Lozano P, Ros G, Solano F. Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critical Overview of Their Metabolic Interconnections. *Int J Mol Sci*. 2023 May;24(11).
122. Hunt J V, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J*. 1988 Nov;256(1):205–12.
123. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014 Feb;18(1):1–14.
124. Naudí A, Jové M, Ayala V, Portero-Otín M, Pamplona R. Glicación de proteínas mitocondriales, estrés oxidativo y envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol* [Internet]. 2010;45(3):156–66. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-geriatria-gerontologia-124-articulo-glicacion-proteinas-mitocondriales-estres-oxidativo-S0211139X10000338>
125. Jubaidi FF, Zainalabidin S, Taib IS, Abdul Hamid Z, Mohamad Anuar NN, Jalil J, et al. The Role of PKC-MAPK Signalling Pathways in the Development of Hyperglycemia-Induced Cardiovascular Complications. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug;23(15).
126. van den Oever IAM, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:792393.
127. Elumalai S, Karunakaran U, Moon JS, Won KC. NADPH Oxidase (NOX) Targeting in Diabetes: A Special Emphasis on Pancreatic β -Cell Dysfunction. *Cells*. 2021 Jun;10(7).
128. To K, Cao R, Yegiazaryan A, Owens J, Nguyen T, Sasaninia K, et al. Effects of Oral Liposomal Glutathione in Altering the Immune Responses Against Mycobacterium tuberculosis and the Mycobacterium bovis BCG Strain in Individuals With Type 2 Diabetes. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:657775.
129. Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med*. 2009 Apr;360(16):1646–54.

130. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014 Jan 4; 383 (9911): 69–82.
131. Craig ME, Jefferies C, Dabelea D, Balde N, Seth A, Donaghue KC. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 2014; 19 (Suppl 27): 7–19.
132. Knip M, Virtanen SM, Akerblom HK. Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91:1506–13.
133. Svoren BM, Volkening LK, Wood JR, Laffel LM. Significant vitamin D deficiency in youth with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr*. 2009; 154:132–34.
134. Blanton D, Han Z, Bierschenk L, et al. Reduced serum vitamin D-binding protein levels are associated with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011; 60:2566–70.
135. Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM, et al. Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011; 60:1624–31.
136. Yeung WC, Rawlinson WD, Craig ME. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ*. 2011; 342:35.
137. Stene LC, Rewers M. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies. *Clin Exp Immunol*. 2012; 168:12–23.
138. Bach JF, Chatenoud L. The hygiene hypothesis: an explanation for the increased frequency of insulin-dependent diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2:a007799.
139. Boerner BP, Sarvetnick NE. Type 1 diabetes: role of intestinal microbiome in humans and mice. *Ann NY Acad Sci*. 2011; 1243: 103–18.
140. Leslie RD. Predicting adult-onset autoimmune diabetes: clarity from complexity. *Diabetes*. 2010; 59: 330–31.
141. Syed FZ. Type 1 Diabetes Mellitus. *Ann Intern Med*. 2022 Mar; 175(3): ITC33-ITC48. doi: 10.7326/AITC202203150.
142. Gregory GA, Robinson TIG, Linklater SE, Wang F, Colagiuri S, de Beaufort C, et al. Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2022 Oct;10(10):741–60.
143. Ogle GD, James S, Dabelea D, Pihoker C, Svensson J, Maniam J, et al. Global estimates of incidence of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Atlas, 10th edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022 Jan;183:109083.
144. Tuomilehto J, Ogle GD, Lund-Blix NA, Stene LC. Update on Worldwide Trends in Occurrence of Childhood Type 1 Diabetes in 2020. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2020; 17 (Suppl 1): 198-209. doi: 10.17458/per.vol17.2020.tol.epidemiologychildtype1diabetes.

145. National Cardiovascular Intelligence Network (NCVIN)/NHS Diabetes Prevention Programme (NHS DPP). Nondiabetic hyperglycaemia. London: Public Health England; 2015. Available at: <https://www.england.nhs.uk/diabetes/diabetes-prevention/>.
146. Heianza Y, Hara S, Arase Y, Saito K, Fujiwara K, et al. HbA1c 5·7-6·4% and impaired fasting plasma glucose for diagnosis of prediabetes and risk of progression to diabetes in Japan (TOPICS 3): a longitudinal cohort study. *Lancet*. 2011; 378(9786): 147–55.
147. Richter B, Hemmingsen B, Metzendorf M-I, Takwoingi Y. Development of type 2 diabetes mellitus in people with intermediate hyperglycaemia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018; 10:CD012661; DOI: 10.1002/14651858.CD012661.pub2.
148. Huang Y, Cai X, Mai W, Li M, Hu Y. Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2016; 355: i5953; DOI:10.1136/bmj.i5953.
149. Yeboah J, Bertoni AG, Herrington DM, Post WS, Burke GL. Impaired fasting glucose and the risk of incident diabetes mellitus and cardiovascular events in an adult population: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol*. 2011 Jul;58(2):140–6.
150. Diabetes Prevention Program Research Group, Knowler WC, Fowler SE, Hamman RF, Christophi CA, Hoffman HJ, et al. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet*. 2009; 374 (9702): 1677–86.
151. Howells L, Musaddaq B, McKay AJ, Majeed A. Clinical impact of lifestyle interventions for the prevention of diabetes: an overview of systematic reviews. *BMJ Open*. 2016; 6(12): e013806; DOI: 10.1136/bmjopen-2016-013806.
152. Gregg EW, Li Y, Wang J, Burrows NR, Ali MK, Rolka D, et al. Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990–2010. *N Engl J Med*. 2014; 370(16): 1514–23.
153. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol*. 1999; 48(5): 643–8.
154. Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Rosner BA, Speizer FE, Manson JE. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*. 1997; 145(7): 614-9.
155. Zheng Y, Manson JE, Yuan C, Liang MH, Grodstein F, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Associations of Weight Gain From Early to Middle Adulthood With Major Health Outcomes Later in Life. *JAMA*. 2017; 318(3): 255-269. doi: 10.1001/jama.2017.7092.
156. Lebovitz HE, Banerji MA. Point: visceral adiposity is causally related to insulin resistance. *Diabetes Care*. 2005; 28(9): 2322-5. doi: 10.2337/diacare.28.9.2322.
157. IDF Clinical Practice Recommendations for Managing Type 2 Diabetes in Primary Care. International Diabetes Federation; 2019.
158. Andújar-Plata P, Pi-Sunyer X, Laferrère B. Metformin effects revisited. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012; 95(1): 1-9. doi: 10.1016/j.diabres.2011.09.022.
159. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*. 2014; 20(6): 953-66. doi: 10.1016/j.cmet.2014.09.018.

160. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia*. 2013; 56(9): 1898-906. doi: 10.1007/s00125-013-2991-0.
161. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122(6): 253-70. doi: 10.1042/CS20110386.
162. Lee CB, Chae SU, Jo SJ, Jerng UM, Bae SK. The Relationship between the Gut Microbiome and Metformin as a Key for Treating Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(7): 3566. doi: 10.3390/ijms22073566.
163. Perreault L, Skyler JS, Rosenstock J. Novel therapies with precision mechanisms for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2021; 17(6): 364-377. doi: 10.1038/s41574-021-00489-y.
164. Pallardo Sánchez LF. Sulfonilureas en el tratamiento del paciente con diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinología y Nutrición* [Internet]. 2008;55:17–25. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-sulfonilureas-el-tratamiento-del-paciente-S1575092208762594>
165. Gomis R. Inhibidores de las disacaridasas. *Endocrinología y Nutrición* [Internet]. 2008;55:13–6. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-inhibidores-disacaridasas-S1575092208762582>
166. Benavides Moraz MJ, Bruscas Alijarde MJ, Mozota Duarte J, Bruscas Alijarde MJ, Medrano Sanz S. Los nuevos antidiabéticos orales para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Medicina Integral* [Internet]. 2000;36(9):355–8. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-los-nuevos-antidiabeticos-orales-el-10022164>
167. Seguí Díaz M. Uso de inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 en pacientes con diabetes en situaciones especiales. *Medicina de Familia SEMERGEN* [Internet]. 2018;44:18–25. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-familia-semergen-40-articulo-uso-inhibidores-dipeptidil-peptidasa-4-S113835931830371X>
168. Buitrago Sandoval AF, Sánchez Vallejo CA. Mecanismos de acción de los inhibidores de cotransportador de sodio y glucosa tipo 2 —SGLT2—: Más allá del control de la glicemia. *Revista Colombiana de Cardiología* [Internet]. 2020;27:22–5. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-colombiana-cardiologia-203-articulo-mecanismos-accion-inhibidores-cotransportador-sodio-S0120563319302220>
169. Jebeile H, Kelly AS, O'Malley G, Baur LA. Obesity in children and adolescents: epidemiology, causes, assessment, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2022; 10(5): 351-365. doi: 10.1016/S2213-8587(22)00047-X.
170. Lee EY, Yoon KH. Epidemic obesity in children and adolescents: risk factors and prevention. *Front Med*. 2018; 12(6): 658-666. doi: 10.1007/s11684-018-0640-1.
171. GBD 2015 Obesity Collaborators; Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*. 2017; 377(1): 13-27. doi: 10.1056/NEJMoa1614362.

172. Wei JN, Sung FC, Lin CC, Lin RS, Chiang CC, Chuang LM. National surveillance for type 2 diabetes mellitus in Taiwanese children. *JAMA*. 2003; 290(10): 1345-50. doi: 10.1001/jama.290.10.1345.
173. Mahajan A, Taliun D, Thurner M, Robertson NR, Torres JM, Rayner NW, et al. Fine-mapping type 2 diabetes loci to single-variant resolution using high-density imputation and islet-specific epigenome maps. *Nat Genet*. 2018; 50(11): 1505-1513.
174. Seiglie JA, Marcus ME, Ebert C, Prodromidis N, Geldsetzer P, Theilmann M, et al. Diabetes Prevalence and Its Relationship With Education, Wealth, and BMI in 29 Low- and Middle-Income Countries. *Diabetes Care*. 2020; 43(4): 767-775. doi: 10.2337/dc19-1782.
175. Fazeli Farsani S, van der Aa MP, van der Vorst MMJ, Knibbe CAJ, de Boer A. Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: a systematic review and evaluation of methodological approaches. *Diabetologia*. 2013 Jul;56(7):1471–88.
176. Kim G, Divers J, Fino NF, Dabelea D, Lawrence JM, Reynolds K, et al. Trends in prevalence of cardiovascular risk factors from 2002 to 2012 among youth early in the course of type 1 and type 2 diabetes. The SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Pediatr Diabetes*. 2019 Sep;20(6):693–701.
177. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis*. 2005 Feb;7(1):63–80.
178. Nguyen TT, Ta QTH, Nguyen TKO, Nguyen TTD, Giau V Van. Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr;21(9).
179. Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, Ma YH, Tan L, Yu JT. The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *J Prev Alzheimers Dis*. 2021;8(3):313–21.
180. Fiore V, De Rosa A, Falasca P, Marci M, Guastamacchia E, Licchelli B, et al. Focus on the Correlations between Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2019;19(5):571–9.
181. Janoutová J, Machaczka O, Zatloukalová A, Janout V. Is Alzheimer's disease a type 3 diabetes? A review. *Cent Eur J Public Health*. 2022 Sep;30(3):139–43.
182. de la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's Disease is Type 3 Diabetes—Evidence Reviewed. *J Diabetes Sci Technol [Internet]*. 2008;2(6):1101–13. Available from: <https://doi.org/10.1177/193229680800200619>
183. Akter K, Lanza EA, Martin SA, Myronyuk N, Rua M, Raffa RB. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment? *Br J Clin Pharmacol*. 2011 Mar;71(3):365–76.
184. Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol Aging*. 1995;16(3):353–5.

185. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002 Jul;297(5580):353–6.
186. Zolotusky KA, Nelson MR, Huang Y. An Alzheimer's-disease-protective APOE mutation. *Nat Med*. 2019 Nov;25(11):1648–9.
187. World Health Organization. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy. Geneva: World Health Organization; 2013. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85975/1/WHO_NMH_MND_13.2_eng.pdf.
188. Hod M, Kapur A, Sacks DA, Hadar E, Agarwal M, Di Renzo GC, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Initiative on gestational diabetes mellitus: A pragmatic guide for diagnosis, management, and care. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015 Oct;131 Suppl:S173-211.
189. Rivas A. Diabetes y Embarazo: Acuerdos y Controversias sobre el diagnóstico y tratamiento. *Salus* [Internet]. 2015;19:27–33. Available from: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382015000100006&nrm=iso
190. Guariguata L, Linnenkamp U, Beagley J, Whiting DR, Cho NH. Global estimates of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014; 103 (2): 176-85. doi: 10.1016/j.diabres.2013.11.003.
191. Immanuel J, Simmons D. Screening and treatment for early-onset gestational diabetes mellitus: A systematic review and metaanalysis. *Curr Diab Rep*. 2017 Oct 2; 17(11): 115.
192. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37 Suppl 1: S81–90.
193. Stern C, Schwarz S, Moser G, Cvitic S, Jantscher-Krenn E, Gauster M, et al. Placental Endocrine Activity: Adaptation and Disruption of Maternal Glucose Metabolism in Pregnancy and the Influence of Fetal Sex. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov;22(23).
194. Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, et al. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*. 2010 Mar;33(3):676–82.
195. Saeedi M, Cao Y, Fadl H, Gustafson H, Simmons D. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus when implementing the IADPSG criteria: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2021; 172:108642.
196. Song C, Lyu Y, Li C, Liu P, Li J, Ma RC, et al. Long-term risk of diabetes in women at varying durations after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis with more than 2 million women. *Obes Rev*. 2018; 19(3): 421–9.
197. Kc K, Shakya S, Zhang H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. *Ann Nutr Metab*. 2015; 66 Suppl 2: 14-20. doi: 10.1159/000371628.
198. Fetita L-S, Sobngwi E, Serradas P, Calvo F, Gautier J-F. Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(10): 3718–24.

199. World Health Organization. Classification of diabetes mellitus. World Health Organization; 2019. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325182>.
200. Blanco Carrasco AJ. ¿Por qué debemos preocuparnos de diagnosticar una diabetes monogénica? *Av Diabetol*. 2013; 29 (5): 126-132. doi: 10.1016/j.avdiab.2013.07.001.
201. Hattersley AT, Greeley SAW, POLAK M, Rubio-Cabezas O et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 2018; 19(Suppl 27) :47-63.
202. Vaxillaire M, Bonnefond A, Froguel P. The lessons of early-onset monogenic diabetes for the understanding of diabetes pathogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012; 26(2): 171–87.
203. World Health Organization. Obesity. Available from: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1.
204. Al-Sharbatti S, Shaikh R, Mathew E, Sreedharan J, Muttappallymyalil J, Basha S. The Use of Obesity Indicators for the Prediction of Hypertension Risk among Youth in the United Arab Emirates. *Iran J Public Health*. 2011; 40(3): 33-40.
205. Freedman DS, Horlick M, Berenson GS. A comparison of the Slaughter skinfold-thickness equations and BMI in predicting body fatness and cardiovascular disease risk factor levels in children. *Am J Clin Nutr*. 2013; 98(6): 1417-24.
206. Wohlfahrt-Veje C, Tinggaard J, Winther K, Mouritsen A, Hagen CP, Mieritz MG, et al. Body fat throughout childhood in 2647 healthy Danish children: agreement of BMI, waist circumference, skinfolds with dual X-ray absorptiometry. *Eur J Clin Nutr*. 2014 Jun;68(6):664–70.
207. Steinberger J, Jacobs DR, Raatz S, Moran A, Hong CP, Sinaiko AR. Comparison of body fatness measurements by BMI and skinfolds vs dual energy X-ray absorptiometry and their relation to cardiovascular risk factors in adolescents. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Nov;29(11):1346–52.
208. Flegal KM, Graubard BI. Estimates of excess deaths associated with body mass index and other anthropometric variables. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89(4): 1213-9. doi: 10.3945/ajcn.2008.26698.
209. Freedman DS, Katzmarzyk PT, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. Relation of body mass index and skinfold thicknesses to cardiovascular disease risk factors in children: the Bogalusa Heart Study. *Am J Clin Nutr*. 2009; 90(1): 210-6.
210. Schutz Y, Flatt JP, Jéquier E. Failure of dietary fat intake to promote fat oxidation: a factor favoring the development of obesity. *Am J Clin Nutr*. 1989 Aug;50(2):307–14.
211. Swain-Lenz D, Berrio A, Safi A, Crawford GE, Wray GA. Comparative Analyses of Chromatin Landscape in White Adipose Tissue Suggest Humans May Have Less Beigeing Potential than Other Primates. *Genome Biol Evol* [Internet]. 2019 Jul 1;11(7):1997–2008. Available from: <https://doi.org/10.1093/gbe/evz134>
212. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci*. 2013 Oct;36(10):587–97.

213. Longman DP, Merzbach V, Pinto JM, Atkinson LH, Wells JCK, Gordon D, et al. Alternative Metabolic Strategies are Employed by Endurance Runners of Different Body Sizes; Implications for Human Evolution. *Adaptive Human Behavior and Physiology* [Internet]. 2022;8(1):79–97. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40750-021-00183-3>
214. Muscella A, Stefàno E, Lunetti P, Capobianco L, Marsigliante S. The Regulation of Fat Metabolism During Aerobic Exercise. *Biomolecules*. 2020 Dec;10(12).
215. Harvard Health Publishing, Harvard Medical School; 2019. Available at: <https://www.health.harvard.edu/staying-healthy/why-people-become-overweight>.
216. Lake A, Townshend T. Obesogenic environments: exploring the built and food environments. *J R Soc Promot Health*. 2006; 126(6): 262-7. doi: 10.1177/1466424006070487.
217. Nicolaidis S. Environment and obesity. *Metabolism*. 2019; 100S: 153942. doi: 10.1016/j.metabol.2019.07.006.
218. Safaei M, Sundararajan EA, Driss M, Boulila W, Shapi'i A. A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. *Comput Biol Med*. 2021 Sep;136:104754.
219. International Diabetes Federation and World Obesity Federation. Obesity and Type 2 Diabetes: a Joint Approach to Halt the Rise. 2022.
220. World Health Organization. Physical activity. WHO. https://www.who.int/health-topics/physical-activity#tab=tab_2. Accessed March 31, 2023.
221. Cheng H, Montgomery S, Green A, Furnham A. Biomedical, psychological, environmental and behavioural factors associated with adult obesity in a nationally representative sample. *J Public Health (Oxf)*. 2020; 42(3): 570-578. doi: 10.1093/pubmed/fdz009.
222. Pinto Pereira SM, De Stavola BL, Rogers NT, Hardy R, Cooper R, Power C. Adult obesity and mid-life physical functioning in two British birth cohorts: investigating the mediating role of physical inactivity. *Int J Epidemiol*. 2020; 49(3): 845-856.
223. FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2021. The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cb4474en>.
224. Keramat SA, Alam K, Gow J, Biddle SJH. Impact of Disadvantaged Neighborhoods and Lifestyle Factors on Adult Obesity: Evidence From a 5-Year Cohort Study in Australia. *Am J Health Promot*. 2021; 35(1): 28-37. doi: 10.1177/0890117120928790.
225. Micha R, Khatibzadeh S, Shi P, Andrews KG, Engell RE, Mozaffarian D. Global, regional and national consumption of major food groups in 1990 and 2010: a systematic analysis including 266 country-specific nutrition surveys worldwide. *BMJ Open*. 2015 Sep;5(9):e008705.
226. Felső R, Lohner S, Hollódy K, Erhardt É, Molnár D. Relationship between sleep duration and childhood obesity: Systematic review including the potential underlying mechanisms. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017; 27(9): 751-761.

227. Herrera BM, Lindgren CM. The genetics of obesity. *Curr Diab Rep.* 2010; 10(6): 498-505. doi: 10.1007/s11892-010-0153-z.
228. Kadouh H, Acosta A. Current paradigms in the etiology of obesity. *Tech Gastrointest Endosc.* 2017; 19 (1): 2-11. <https://doi.org/10.1016/j.tgie.2016.12.001>.
229. Ang YN, Wee BS, Poh BK et al. Multifactorial Influences of Childhood Obesity. *Curr Obes Rep.* 2013; 2(1): 10–22. <https://doi.org/10.1007/s13679-012-0042-7>.
230. Sartorius B, Veerman LJ, Manyema M, Chola L, Hofman K. Determinants of Obesity and Associated Population Attributability, South Africa: Empirical Evidence from a National Panel Survey, 2008-2012. *PLoS One.* 2015; 10(6): e0130218.
231. McLaren L. Socioeconomic status and obesity. *Epidemiol Rev.* 2007; 29: 29-48. doi: 10.1093/epirev/mxm001.
232. Power EM. Determinants of healthy eating among low-income Canadians. *Can J Public Health.* 2005; 96 Suppl 3: S37-42, S42-8.
233. Puoane T, Steyn K, Bradshaw D, Laubscher R, Fourie J, Lambert V, Mbananga N. Obesity in South Africa: the South African demographic and health survey. *Obes Res.* 2002; 10(10): 1038-48.
234. Kickbusch I, Allen L, Franz C. The commercial determinants of health. *Lancet Glob Health.* 2016; 4(12): e895-e896. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30217-0.
235. Choukem SP, Tochie JN, Sibetcheu AT, Nansseu JR, Hamilton-Shield JP. Overweight/obesity and associated cardiovascular risk factors in sub-Saharan African children and adolescents: a scoping review. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2020; 6.
236. Ishida A, Li Y, Matsuda O, Ishida E. Factors affecting adult overweight and obesity in urban China. *Pertanika J. Soc. Sci. Human.* 2020; 28(1): 503-513.
237. Sun Y, Wang S, Sun X. Estimating neighbourhood-level prevalence of adult obesity by socio-economic, behavioural and built environment factors in New York City. *Public Health.* 2020; 186: 57-62. doi: 10.1016/j.puhe.2020.05.003.
238. Endalifer ML, Diress G. Epidemiology, Predisposing Factors, Biomarkers, and Prevention Mechanism of Obesity: A Systematic Review. *J Obes.* 2020; 2020:6134362. doi: 10.1155/2020/6134362.
239. Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes Facts.* 2017; 10(3): 207-215. doi: 10.1159/000471488.
240. Angeliki A, Dimitrios P, Chara T. Maternal obesity and its association with the mode of delivery and the neonatal outcome in induced labour: Implications for midwifery practice. *Eur J Midwifery.* 2018; 2:4. doi: 10.18332/ejm/85792.
241. Adewuyi EO, Auta A, Khanal V, Tapshak SJ, Zhao Y. Cesarean delivery in Nigeria: prevalence and associated factors-a population-based cross-sectional study. *BMJ Open.* 2019; 9(6): e027273. doi: 10.1136/bmjopen-2018-027273.

242. Maroufizadeh S, Amini P, Hosseini M, Almasi-Hashiani A, Mohammadi M, Navid B, Omani-Samani R. Determinants of Cesarean Section among Primiparas: A Comparison of Classification Methods. *Iran J Public Health*. 2018; 47(12): 1913-1922.
243. Blomberg M. Maternal obesity, mode of delivery, and neonatal outcome. *Obstet Gynecol*. 2013; 122(1): 50-55. doi: 10.1097/AOG.0b013e318295657f.
244. Al-Raddadi R, Bahijri SM, Jambi HA, Ferns G, Tuomilehto J. The prevalence of obesity and overweight, associated demographic and lifestyle factors, and health status in the adult population of Jeddah, Saudi Arabia. *Ther Adv Chronic Dis*. 2019;10:2040622319878997.
245. Censin JC, Peters SAE, Bovijn J, Ferreira T, Pulit SL, Mägi R, Mahajan A, Holmes MV, Lindgren CM. Causal relationships between obesity and the leading causes of death in women and men. *PLoS Genet*. 2019; 15(10): e1008405. doi: 10.1371/journal.pgen.1008405.
246. Fruh SM. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *J Am Assoc Nurse Pract*. 2017; 29(S1): S3-S14. doi: 10.1002/2327-6924.12510.
247. Hingorani AD, Finan C, Schmidt AF. Obesity causes cardiovascular diseases: adding to the weight of evidence. *Eur Heart J*. 2020; 41(2): 227-230. doi: 10.1093/eurheartj/ehz569.
248. Evangelista GCM, Salvador PA, Soares SMA, Barros LRC, Xavier FHDC, Abdo LM, et al. 4T1 Mammary Carcinoma Colonization of Metastatic Niches Is Accelerated by Obesity. *Front Oncol*. 2019; 9: 685. doi: 10.3389/fonc.2019.00685.
249. Dias KA, Ramos JS, Wallen MP, Davies PSW, Cain PA, Leong GM, et al. Accuracy of Longitudinal Assessment of Visceral Adipose Tissue by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in Children with Obesity. *J Obes*. 2019; 2019: 2193723. doi: 10.1155/2019/2193723.
250. Almuwaqqat Z, O'Neal WT, Norby FL, Lutsey PL, Selvin E, Soliman EZ, Chen LY, Alonso A. Joint Associations of Obesity and NT-proBNP With the Incidence of Atrial Fibrillation in the ARIC Study. *J Am Heart Assoc*. 2019; 8(19): e013294.
251. Hruby A, Manson JE, Qi L, Malik VS, Rimm EB, Sun Q, Willett WC, Hu FB. Determinants and Consequences of Obesity. *Am J Public Health*. 2016; 106(9): 1656-62. doi: 10.2105/AJPH.2016.303326.
252. Cao Y, Sun G, Liu R, Sun A, Zhang Q, Li Y, Wang L, Chao X, Zhou X, Zhang S, Chen R. Plasma triglyceride levels and central obesity predict the development of kidney injury in Chinese community older adults. *Ren Fail*. 2019; 41(1): 946-953.
253. Barber TM, Hanson P, Weickert MO, Franks S. Obesity and Polycystic Ovary Syndrome: Implications for Pathogenesis and Novel Management Strategies. *Clin Med Insights Reprod Health*. 2019; 13: 1179558119874042. doi: 10.1177/1179558119874042.
254. Hill AJ, Rodriguez Lopez R, Caterson ID. The relationship between obesity and tertiary education outcomes: a systematic review. *Int J Obes (Lond)*. 2019; 43(11): 2125-2133. doi: 10.1038/s41366-018-0256-1.

255. Skea ZC, Aceves-Martins M, Robertson C, De Bruin M, Avenell A; REBALANCE team. Acceptability and feasibility of weight management programmes for adults with severe obesity: a qualitative systematic review. *BMJ Open*. 2019; 9(9): e029473.
256. Ho JH, Adam S, Azmi S, Ferdousi M, Liu Y, Kalteniece A, et al. Male sexual dysfunction in obesity: The role of sex hormones and small fibre neuropathy. *PLoS One*. 2019; 14(9): e0221992. doi: 10.1371/journal.pone.0221992.
257. Templin T, Cravo Oliveira Hashiguchi T, Thomson B, Dieleman J, Bendavid E. The overweight and obesity transition from the wealthy to the poor in low- and middle-income countries: A survey of household data from 103 countries. *PLoS Med*. 2019 Nov;16(11):e1002968.
258. Abdullah A, Peeters A, de Courten M, Stoelwinder J. The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010; 89(3): 309-19.
259. Leitner DR, Frühbeck G, Yumuk V, Schindler K, Micic D, Woodward E, Toplak H. Obesity and Type 2 Diabetes: Two Diseases with a Need for Combined Treatment Strategies - EASO Can Lead the Way. *Obes Facts*. 2017; 10(5): 483-492. doi: 10.1159/000480525.
260. Frühbeck G, Toplak H, Woodward E, Yumuk V, Maislos M, Oppert JM. Obesity: the gateway to ill health - an EASO position statement on a rising public health, clinical and scientific challenge in Europe. *Obes Facts*. 2013;6(2):117-20.
261. Chobot A, Górowska-Kowolik K, Sokołowska M, Jarosz-Chobot P. Obesity and diabetes- Not only a simple link between two epidemics. *Diabetes Metab Res Rev*. 2018; 34(7): e3042. doi: 10.1002/dmrr.3042.
262. Abbasi A, Juszczak D, van Jaarsveld CHM, Gulliford MC. Body Mass Index and Incident Type 1 and Type 2 Diabetes in Children and Young Adults: A Retrospective Cohort Study. *J Endocr Soc*. 2017; 1(5): 524-537. doi: 10.1210/js.2017-00044.
263. Gatineau M, Hancock C, Holman N, Outhwaite H, Oldridge L, Christie A, Ells L. Adult obesity and type 2 diabetes. Oxford: Public Health England. 2014.
264. Leung MY, Carlsson NP, Colditz GA, Chang SH. The Burden of Obesity on Diabetes in the United States: Medical Expenditure Panel Survey, 2008 to 2012. *Value Health*. 2017; 20(1): 77-84. doi: 10.1016/j.jval.2016.08.735.
265. George AM, Jacob AG, Fogelfeld L. Lean diabetes mellitus: An emerging entity in the era of obesity. *World J Diabetes*. 2015; 6(4): 613-20. doi: 10.4239/wjd.v6.i4.613.
266. Swinburn BA, Kraak VI, Allender S, Atkins VJ, Baker PI, Bogard JR, et al. The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. *Lancet*. 2019; 393(10173): 791-846. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32822-8.
267. Kalra S. Diabetesity. *J Pak Med Assoc*. 2013; 63(4): 532-4.
268. Wilk K, Korytek W, Pelczyńska M, Moszak M, Bogdański P. The Effect of Artificial Sweeteners Use on Sweet Taste Perception and Weight Loss Efficacy: A Review. *Nutrients*. 2022; 14(6): 1261. doi: 10.3390/nu14061261.

269. Kochem MC, Hanselman EC, Breslin PAS. Activation and inhibition of the sweet taste receptor TAS1R2-TAS1R3 differentially affect glucose tolerance in humans. *PLoS One*. 2024;19(5):e0298239.
270. Tian Y, Deng Y, Zhang W, Mu W. Sucrose isomers as alternative sweeteners: properties, production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019; 103(21-22): 8677-8687. doi: 10.1007/s00253-019-10132-6.
271. Peters S, Rose T, Moser M. Sucrose: a prospering and sustainable organic raw material. *Top Curr Chem*. 2010; 294: 1–23. https://doi.org/10.1007/128_2010_58.
272. Hodoniczky J, Morris CA, Rae AL. Oral and intestinal digestion of oligosaccharides as potential sweeteners: a systematic evaluation. *Food Chem*. 2012; 132: 1951–1958.
273. Keyhani-Nejad F, Kemper M, Schueler R, Pivovarova O, Rudovich N, Pfeiffer AFH. Effects of palatinose and sucrose intake on glucose metabolism and incretin secretion in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2016; 39: e38–e39.
274. Varsamis P, Formosa MF, Larsen RN, Reddy-Luthmoodoo M, Jennings GL, Cohen ND, et al. Between-meal sucrose-sweetened beverage consumption impairs glycaemia and lipid metabolism during prolonged sitting: A randomized controlled trial. *Clin Nutr*. 2019 Aug;38(4):1536–43.
275. Warfa K, Drake I, Wallström P, Engström G, Sonestedt E. Association between sucrose intake and acute coronary event risk and effect modification by lifestyle factors: Malmö Diet and Cancer Cohort Study. *Br J Nutr*. 2016; 116: 1611–1620.
276. Rodrigues N, Peng M, Oey I, Venn BJ. Glycaemic, uricaemic and blood pressure response to beverages with partial fructose replacement of sucrose. *Eur J Clin Nutr*. 2018; 72(12): 1717-1723. doi: 10.1038/s41430-018-0134-x.
277. Lieberman M, Marks A, Peet A. Digestion, absorption, and transport of carbohydrates. Marks basic medical biochemistry: a clinical approach. 4th ed. Lippincott William and Williams. 2013; p. 493-511.
278. Tappy L, Egli L, Christel T. Metabolism of nutritive sweeteners in humans. In: Rippe JM (ed). Fructose, high fructose corn syrup, sucrose and health. Humana Press. 2014; p. 35-48.
279. Thornley S, Tayler R, Sikaris K. Sugar restriction: the evidence for a drug-free intervention to reduce cardiovascular disease risk. *Intern Med J*. 2012; 42 Suppl 5: 46-58. doi: 10.1111/j.1445-5994.2012.02902.x.
280. Febbraio MA, Karin M. 'Sweet death': Fructose as a metabolic toxin that targets the gut-liver axis. *Cell Metab*. 2021; 33(12): 2316-2328. doi: 10.1016/j.cmet.2021.09.004.
281. Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*. 2017; 9(9):981. doi: 10.3390/nu9090981.
282. Geidl-Flueck B, Hochuli M, Németh Á, Eberl A, Derron N, Köfeler HC, et al. Fructose- and sucrose- but not glucose-sweetened beverages promote hepatic de novo lipogenesis: A randomized controlled trial. *J Hepatol*. 2021; 75(1): 46-54.

283. Federico A, Rosato V, Masarone M, Torre P, Dallio M, Romeo M, Persico M. The Role of Fructose in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Old Relationship and New Insights. *Nutrients*. 2021; 13(4): 1314. doi: 10.3390/nu13041314.
284. Roeb E, Weiskirchen R. Fructose and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 634344. doi: 10.3389/fphar.2021.634344.
285. Sharma A, Amarnath S, Thulasimani M, Ramaswamy S. Artificial sweeteners as a sugar substitute: Are they really safe? *Indian J Pharmacol*. 2016; 48(3): 237-40. doi: 10.4103/0253-7613.182888.
286. Lertrit A, Srimachai S, Saetung S, Chanprasertyothin S, Chailurkit LO, Areevut C, et al. Effects of sucralose on insulin and glucagon-like peptide-1 secretion in healthy subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*. 2018 Nov;55–56:125–30.
287. Araújo JR, Martel F, Keating E. Exposure to non-nutritive sweeteners during pregnancy and lactation: Impact in programming of metabolic diseases in the progeny later in life. *Reprod Toxicol*. 2014; 49: 196-201. doi: 10.1016/j.reprotox.2014.09.007.
288. Azad MB, Archibald A, Tomczyk MM, Head A, Cheung KG, de Souza RJ, et al. Nonnutritive sweetener consumption during pregnancy, adiposity, and adipocyte differentiation in offspring: evidence from humans, mice, and cells. *Int J Obes (Lond)*. 2020 Oct;44(10):2137–48.
289. Mishra A, Ahmed K, Froghi S, Dasgupta P. Systematic review of the relationship between artificial sweetener consumption and cancer in humans: analysis of 599,741 participants. *Int J Clin Pract*. 2015; 69(12): 1418-26. doi: 10.1111/ijcp.12703.
290. Toews I, Lohner S, de Gaudry D, Sommer H, Meerpohl JJ. Association between intake of non-sugar sweeteners and health outcomes: systematic review and meta-analyses of randomised and non-randomised controlled trials and observational studies. *BMJ [Internet]*. 2019;364. Available from: <https://www.bmj.com/content/364/bmj.k4718>
291. Smeets PA, de Graaf C, Stafleu A, van Osch MJ, van der Grond J. Functional magnetic resonance imaging of human hypothalamic responses to sweet taste and calories. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82(5): 1011-6. doi: 10.1093/ajcn/82.5.1011.
292. Tan HE, Sisti AC, Jin H, Vignovich M, Villavicencio M, Tsang KS, Goffer Y, Zuker CS. The gut-brain axis mediates sugar preference. *Nature*. 2020; 580(7804): 511-516. doi: 10.1038/s41586-020-2199-7.
293. Nitz M, Fenili D, Darabie AA, Wu L, Cousins JE, McLaurin J. Modulation of amyloid-beta aggregation and toxicity by inosose stereoisomers. *FEBS J*. 2008; 275(8): 1663-74. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06321.x.
294. Fenili D, Weng YQ, Aubert I, Nitz M, McLaurin J. Sodium/myo-Inositol transporters: substrate transport requirements and regional brain expression in the TgCRND8 mouse model of amyloid pathology. *PLoS One*. 2011; 6(8): e24032.
295. Hipps PP, Holland WH, Sherman WR. Interconversion of myo- and scyllo-inositol with simultaneous formation of neo-inositol by an NADP⁺ dependent epimerase from

- bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977; 77(1): 340-6. doi: 10.1016/s0006-291x(77)80202-7.
296. Pak Y, Huang LC, Lilley KJ, Larner J. In vivo conversion of [3H]myoinositol to [3H]chiroinositol in rat tissues. *J Biol Chem.* 1992; 267(24): 16904-10.
 297. Ryals PE, Kersting MC. Sodium-dependent uptake of [3H]scyllo-inositol by *Tetrahymena*: incorporation into phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-linked glycans, and polyphosphoinositols. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 366(2): 261-6.
 298. Fenili D, Brown M, Rappaport R, McLaurin J. Properties of scyllo-inositol as a therapeutic treatment of AD-like pathology. *J Mol Med (Berl).* 2007; 85(6): 603-11. doi: 10.1007/s00109-007-0156-7.
 299. Hipps PP, Ackermann KE, Sherman WR. Inositol epimerase--inosose reductase from bovine brain. *Methods Enzymol.* 1982;89 Pt D:593-8. doi: 10.1016/s0076-6879(82)89102-7.
 300. Pak Y, Paule CR, Bao YD, Huang LC, Larner J. Insulin stimulates the biosynthesis of chiro-inositol-containing phospholipids in a rat fibroblast line expressing the human insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(16): 7759-63.
 301. Sun TH, Heimark DB, Nguygen T, Nadler JL, Larner J. Both myo-inositol to chiro-inositol epimerase activities and chiro-inositol to myo-inositol ratios are decreased in tissues of GK type 2 diabetic rats compared to Wistar controls. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 May;293(3):1092-8.
 302. Dersjant-Li Y, Awati A, Schulze H, Partridge G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J Sci Food Agric.* 2015; 95(5): 878-96. doi: 10.1002/jsfa.6998.
 303. Schlemmer U, Jany KD, Berk A, Schulz E, Rechkemmer G. Degradation of phytate in the gut of pigs--pathway of gastro-intestinal inositol phosphate hydrolysis and enzymes involved. *Arch Tierernahr.* 2001; 55(4): 255-80. doi: 10.1080/17450390109386197.
 304. 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(2): 363-370. DOI: 10.1080/10942912.2011.631255.
 305. Ahn CH, Hossain MA, Lee E, Kanth BK, Park PB. Increased salt and drought tolerance by D-pinitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 504(1): 315-320. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.183.
 306. Beemster P, Groenen P, Steegers-Theunissen R. Involvement of inositol in reproduction. *Nutr Rev.* 2002; 60(3): 80-7. doi: 10.1301/00296640260042748.
 307. Kiani AK, Paolacci S, Calogero AE, Cannarella R, Di Renzo GC, Gerli S, et al. From Myo-inositol to D-chiro-inositol molecular pathways. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021; 25(5): 2390-2402. doi: 10.26355/eurev_202103_25279.
 308. Su XB, Ko ALA, Saiardi A. Regulations of myo-inositol homeostasis: Mechanisms, implications, and perspectives. *Adv Biol Regul.* 2023 Jan;87:100921.

309. Bourgeois F, Coady MJ, Lapointe JY. Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT. *J Physiol*. 2005; 563(Pt 2): 333-43. doi: 10.1113/jphysiol.2004.076679.
310. Ostlund RE Jr, Seemayer R, Gupta S, Kimmel R, Ostlund EL, Sherman WR. A stereospecific myo-inositol/D-chiro-inositol transporter in HepG2 liver cells. Identification with D-chiro-[3-3H]inositol. *J Biol Chem*. 1996; 271(17): 10073-8.
311. Greene DA, Lattimer SA. Sodium- and energy-dependent uptake of myo-inositol by rabbit peripheral nerve. Competitive inhibition by glucose and lack of an insulin effect. *J Clin Invest*. 1982; 70(5): 1009-18. doi: 10.1172/jci110688.
312. Coady MJ, Wallendorff B, Gagnon DG, Lapointe JY. Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem*. 2002 Sep;277(38):35219–24.
313. Augustin R, Mayoux E. Mammalian Sugar Transporters. In: Szablewski L, editor. *Glucose Homeostasis* [Internet]. Rijeka: IntechOpen; 2014. Available from: <https://doi.org/10.5772/58325>
314. Ostlund RE Jr, McGill JB, Herskowitz I, Kipnis DM, Santiago JV, Sherman WR. D-chiro-inositol metabolism in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(21): 9988-92. doi: 10.1073/pnas.90.21.9988.
315. Asplin I, Galasko G, Larner J. chiro-inositol deficiency and insulin resistance: a comparison of the chiro-inositol- and the myo-inositol-containing insulin mediators isolated from urine, hemodialysate, and muscle of control and type II diabetic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(13):5924–8.
316. Di Daniel E, Kew JN, Maycox PR. Investigation of the H(+)-myo-inositol transporter (HMIT) as a neuronal regulator of phosphoinositide signalling. *Biochem Soc Trans*. 2009; 37(Pt 5): 1139-43. doi: 10.1042/BST0371139.
317. Poccia D, Larijani B. Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion. *Biochem J*. 2009; 418(2): 233-46. doi: 10.1042/BJ20082105.
318. Li S, Ghosh C, Xing Y, Sun Y. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the Control of Membrane Trafficking. *Int J Biol Sci*. 2020; 16(15): 2761-2774. doi: 10.7150/ijbs.49665.
319. Vance JE. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic*. 2015; 16(1): 1-18. doi: 10.1111/tra.12230.
320. Michell RH. Do inositol supplements enhance phosphatidylinositol supply and thus support endoplasmic reticulum function? *Br J Nutr*. 2018; 120(3): 301-316. doi: 10.1017/S0007114518000946.
321. Sekiya, F. Phospholipase C. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2013; 467–471. doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00346-7.
322. Abel K, Anderson RA, Shears SB. Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism. *J Cell Sci*. 2001; 114(Pt 12): 2207-8. doi: 10.1242/jcs.114.12.2207.
323. Christie WW. Glycosylphosphatidylinositol Anchors for Proteins and Phosphatidylinositol Mannosides. *The LipidWeb*. Recuperado de:

https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/complex/GPIanchor/index.htm. Actualizado el 15 de febrero de 2023.

324. Desnoyer N, Palanivelu R. Bridging the GAPs in plant reproduction: a comparison of plant and animal GPI-anchored proteins. *Plant Reprod.* 2020; 33(3-4): 129-142. doi: 10.1007/s00497-020-00395-9.
325. Heider S, Dangerfield JA, Metzner C. Biomedical applications of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J Lipid Res.* 2016; 57(10): 1778-1788. doi: 10.1194/jlr.R070201.
326. Fujita M, Kinoshita T. GPI-anchor remodeling: potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1821(8): 1050-8. doi: 10.1016/j.bbalip.2012.01.004.
327. Tan RPA, Leshchynska I, Sytnyk V. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules and Their Role in Neuronal Development and Synapse Regulation. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:378.
328. Kinoshita T. Biosynthesis and biology of mammalian GPI-anchored proteins. *Open Biol.* 2020; 10(3): 190290. doi: 10.1098/rsob.190290.
329. Saltiel AR, Siegel MI, Jacobs S, Cuatrecasas P. Putative mediators of insulin action: regulation of pyruvate dehydrogenase and adenylate cyclase activities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79(11): 3513-7. doi: 10.1073/pnas.79.11.3513.
330. Saltiel AR, Cuatrecasas P. Insulin stimulates the generation from hepatic plasma membranes of modulators derived from an inositol glycolipid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(16): 5793-7. doi: 10.1073/pnas.83.16.5793.
331. Mann KJ, Hepworth MR, Raikwar NS, Deeg MA, Seveler D. Effect of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-phospholipase D overexpression on GPI metabolism. *Biochem J.* 2004; 378(Pt 2): 641-8. doi: 10.1042/BJ20031326.
332. Masuda S, Fujishima Y, Maeda N, Tsugawa-Shimizu Y, Nakamura Y, Tanaka Y, et al. Impact of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D on hepatic diacylglycerol accumulation, steatosis, and insulin resistance in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019 Feb;316(2):E239–50.
333. Watkins OC, Yong HEJ, Sharma N, Chan SY. A review of the role of inositols in conditions of insulin dysregulation and in uncomplicated and pathological pregnancy. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022;62(6):1626–73.
334. Huang LC, Fonteles MC, Houston DB, Zhang C, Larner J. Chiroinositol deficiency and insulin resistance. III. Acute glycogenic and hypoglycemic effects of two inositol phosphoglycan insulin mediators in normal and streptozotocin-diabetic rats in vivo. *Endocrinology.* 1993 Feb;132(2):652–7.
335. Kunjara S, Wang DY, Greenbaum AL, McLean P, Kurtz A, Rademacher TW. Inositol phosphoglycans in diabetes and obesity: urinary levels of IPG A-type and IPG P-type, and relationship to pathophysiological changes. *Mol Genet Metab.* 1999; 68(4): 488-502.

336. Kunjara S, McLean P, Greenbaum AL, Rademacher TW. Insight into the role of inositol phosphoglycans in insulin response and the regulation of glucose and lipid metabolism illustrated by the response of adipocytes from two strains of rats. *Mol Genet Metab.* 2008 Jun;94(2):263–6.
337. Saltiel AR, Sorbara-Cazan LR. Inositol glycan mimics the action of insulin on glucose utilization in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Dec;149(3):1084–92.
338. Jones DR, Varela-Nieto I. Diabetes and the role of inositol-containing lipids in insulin signaling. *Mol Med.* 1999; 5(8): 505-14.
339. Larner J, Price JD, Heimark D, Smith L, Rule G, Piccariello T, et al. Isolation, structure, synthesis, and bioactivity of a novel putative insulin mediator. A galactosamine chiro-inositol pseudo-disaccharide Mn²⁺ chelate with insulin-like activity. *J Med Chem.* 2003 Jul;46(15):3283–91.
340. Huang LC, Heimark D, Linko J, Nolan R, Larner J. A model phosphatase 2C --> phosphatase 1 activation cascade via dual control of inhibitor-1 (INH-1) and DARPP-32 dephosphorylation by two inositol glycan putative insulin mediators from beef liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Feb;255(1):150–6.
341. Brautigan DL, Brown M, Grindrod S, Chinigo G, Kruszewski A, Lukasik SM, et al. Allosteric activation of protein phosphatase 2C by D-chiro-inositol-galactosamine, a putative mediator mimetic of insulin action. *Biochemistry.* 2005 Aug;44(33):11067–73.
342. Hiraga A, Kikuchi K, Tamura S, Tsuiki S. Purification and characterization of Mg²⁺-dependent glycogen synthase phosphatase (phosphoprotein phosphatase IA) from rat liver. *Eur J Biochem.* 1981; 119(3): 503-10. doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05636.x.
343. Wang MY, Unger RH. Role of PP2C in cardiac lipid accumulation in obese rodents and its prevention by troglitazone. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 288(1): E216-21. doi: 10.1152/ajpendo.00004.2004.
344. Formoso G, Baldassarre MPA, Ginestra F, Carlucci MA, Bucci I, Consoli A. Inositol and antioxidant supplementation: Safety and efficacy in pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2019; 35(5): e3154. doi: 10.1002/dmrr.3154.
345. Müller G, Wied S, Frick W. Cross talk of pp125(FAK) and pp59(Lyn) non-receptor tyrosine kinases to insulin-mimetic signaling in adipocytes. *Mol Cell Biol.* 2000 Jul;20(13):4708–23.
346. Cuevas BD, Lu Y, Mao M, Zhang J, LaPushin R, Siminovitch K, et al. Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 2001 Jul;276(29):27455–61.
347. Yoshizaki T, Maegawa H, Egawa K, Ugi S, Nishio Y, Imamura T, et al. Protein phosphatase-2C alpha as a positive regulator of insulin sensitivity through direct activation of phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2004 May;279(21):22715–26.
348. Foukas LC, Beeton CA, Jensen J, Phillips WA, Shepherd PR. Regulation of phosphoinositide 3-kinase by its intrinsic serine kinase activity in vivo. *Mol Cell Biol.* 2004 Feb;24(3):966–75.

349. Lundsgaard AM, Fritzen AM, Kiens B. Chapter 36 - Exercise Physiology in Men and Women. In: Legato MJ, editor. *Principles of Gender-Specific Medicine (Third Edition)* [Internet]. Third Edit. San Diego: Academic Press; 2017. p. 525–42. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128035061000176>
350. D’Oria R, Laviola L, Giorgino F, Unfer V, Bettocchi S, Scioscia M. PKB/Akt and MAPK/ERK phosphorylation is highly induced by inositols: Novel potential insights in endothelial dysfunction in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2017; 10: 107-112.
351. Shen H, Shao M, Cho KW, Wang S, Chen Z, Sheng L, et al. Herbal constituent sequoyitol improves hyperglycemia and glucose intolerance by targeting hepatocytes, adipocytes, and β -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Apr;302(8):E932-40.
352. Pitt J, Thorner M, Brautigan D, Larner J, Klein WL. Protection against the synaptic targeting and toxicity of Alzheimer’s-associated A β oligomers by insulin mimetic chiro-inositols. *FASEB J.* 2013; 27(1): 199-207. doi: 10.1096/fj.12-211896.
353. Vilks K, Videja M, Makrecka-Kuka M, Katkevics M, Sevostjanovs E, Grandane A, et al. Long-Chain Acylcarnitines Decrease the Phosphorylation of the Insulin Receptor at Tyr1151 Through a PTP1B-Dependent Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun;22(12).
354. Lorenzo M, Fernández-Veledo S, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, De Alvaro C, Nieto-Vazquez I. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor- α in myocytes and brown adipocytes. *J Anim Sci.* 2008; 86(14 Suppl): E94-104. doi: 10.2527/jas.2007-0462.
355. Pal M, Febbraio MA, Lancaster GI. The roles of c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs) in obesity and insulin resistance. *J Physiol.* 2016; 594(2): 267-79. doi: 10.1113/JP271457.
356. Rehman K, Akash MSH, Liaqat A, Kamal S, Qadir MI, Rasul A. Role of Interleukin-6 in Development of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2017; 27(3): 229-236. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2017019712.
357. Antony PJ, Gandhi GR, Stalin A, Balakrishna K, Toppo E, Sivasankaran K, et al. Myoinositol ameliorates high-fat diet and streptozotocin-induced diabetes in rats through promoting insulin receptor signaling. *Biomed Pharmacother.* 2017 Apr;88:1098–113.
358. Chakraborty C, Doss CG, Bandyopadhyay S, Agoramoorthy G. Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: micro-molecules with a major role in type-2 diabetes. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014; 5(5): 697-712. doi: 10.1002/wrna.1240.
359. Kennington AS, Hill CR, Craig J, Bogardus C, Raz I, Ortmeyer HK, Hansen BC, Romero G, Larner J. Low urinary chiro-inositol excretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1990; 323(6): 373-8. doi: 10.1056/NEJM199008093230603.
360. Daughaday WH, Larner J. The renal excretion of inositol in normal and diabetic human beings. *J Clin Invest.* 1954; 33(3): 326-32. doi: 10.1172/JCI102901.
361. Shashkin PN, Huang LC, Larner J, Vandenhoff GE, Katz A. Fasting decreases the content of D-chiroinositol in human skeletal muscle. *Int J Exp Diabetes Res.* 2002; 3(3): 163-9. doi: 10.1080/15604280214280.

362. Baillargeon JP, Diamanti-Kandarakis E, Ostlund RE Jr, Apridonidze T, Luorno MJ, Nestler JE. Altered D-chiro-inositol urinary clearance in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*. 2006; 29(2): 300-5. doi: 10.2337/diacare.29.02.06.dc05-1070.
363. Bevilacqua A, Carlomagno G, Gerli S, Montanino Oliva M, Devroey P, Lanzone A, et al. Results from the International Consensus Conference on myo-inositol and D-chiro-inositol in Obstetrics and Gynecology--assisted reproduction technology. *Gynecol Endocrinol*. 2015 Jun;31(6):441–6.
364. Nestler, JE. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: recent advances. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*. 2000; 7(6): 345-349. doi: 10.1097/00060793-200012000-00009.
365. Heimark D, McAllister J, Larner J. Decreased myo-inositol to chiro-inositol (M/C) ratios and increased M/C epimerase activity in PCOS theca cells demonstrate increased insulin sensitivity compared to controls. *Endocr J*. 2014; 61(2): 111-7.
366. Unfer V, Dinicola S, Laganà AS, Bizzarri M. Altered Ovarian Inositol Ratios May Account for Pathological Steroidogenesis in PCOS. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(19): 7157. doi: 10.3390/ijms21197157.
367. Carlomagno G, Unfer V, Roseff S. The D-chiro-inositol paradox in the ovary. *Fertil Steril*. 2011; 95(8): 2515-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.027.
368. Dinicola S, Minini M, Unfer V, Verna R, Cucina A, Bizzarri M. Nutritional and Acquired Deficiencies in Inositol Bioavailability. Correlations with Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(10): 2187. doi: 10.3390/ijms18102187.
369. Chatree S, Thongmaen N, Tantivejkul K, Sitticharoon C, Vucenik I. Role of Inositols and Inositol Phosphates in Energy Metabolism. *Molecules*. 2020; 25(21): 5079. doi: 10.3390/molecules25215079.
370. Minozzi M, Nordio M, Pajalich R. The Combined therapy myo-inositol plus D-Chiro-inositol, in a physiological ratio, reduces the cardiovascular risk by improving the lipid profile in PCOS patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013; 17(4): 537-40.
371. Mancini M, Andreassi A, Salvioni M, Pelliccione F, Mantellassi G, Banderali G. Myoinositol and D-Chiro Inositol in Improving Insulin Resistance in Obese Male Children: Preliminary Data. *Int J Endocrinol*. 2016; 2016: 8720342. doi: 10.1155/2016/8720342.
372. Bevilacqua A, Bizzarri M. Inositols in Insulin Signaling and Glucose Metabolism. *Int J Endocrinol*. 2018; 2018: 1968450. doi: 10.1155/2018/1968450.
373. Pintaudi B, Di Vieste G, Bonomo M. The Effectiveness of Myo-Inositol and D-Chiro Inositol Treatment in Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol*. 2016; 2016:9132052. doi: 10.1155/2016/9132052.
374. Chukwuma CI, Ibrahim MA, Islam MS. Myo-inositol inhibits intestinal glucose absorption and promotes muscle glucose uptake: a dual approach study. *J Physiol Biochem*. 2016; 72(4): 791-801. doi: 10.1007/s13105-016-0517-1.
375. Pericuesta E, Laguna-Barraza R, Ramos-Ibeas P, Gutierrez-Arroyo JL, Navarro JA, Vera K, et al. D-Chiro-Inositol Treatment Affects Oocyte and Embryo Quality and Improves

Glucose Intolerance in Both Aged Mice and Mouse Models of Polycystic Ovarian Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug;21(17).

376. Santamaria A, Alibrandi A, Di Benedetto A, Pintaudi B, Corrado F, Facchinetti F, et al. Clinical and metabolic outcomes in pregnant women at risk for gestational diabetes mellitus supplemented with myo-inositol: a secondary analysis from 3 RCTs. *Am J Obstet Gynecol.* 2018 Sep;219(3):300.e1-300.e6.
377. Unfer V, Facchinetti F, Orrù B, Giordani B, Nestler J. Myo-inositol effects in women with PCOS: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Endocr Connect.* 2017; 6(8): 647-658. doi: 10.1530/EC-17-0243.
378. Kamenov Z, Gateva A. Inositols in PCOS. *Molecules.* 2020; 25(23): 5566. doi: 10.3390/molecules25235566.
379. Barker CJ, Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO. Phosphorylated inositol compounds in beta -cell stimulus-response coupling. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 283(6): E1113-22. doi: 10.1152/ajpendo.00088.2002.
380. Barker CJ, Illies C, Fiume R, Gaboardi GC, Yu J, Berggren PO. Diphosphoinositol pentakisphosphate as a novel mediator of insulin exocytosis. *Adv Enzyme Regul.* 2009; 49(1): 168-73. doi: 10.1016/j.advenzreg.2009.01.001.
381. Berggren PO, Barker CJ. A key role for phosphorylated inositol compounds in pancreatic beta-cell stimulus-secretion coupling. *Adv Enzyme Regul.* 2008; 48: 276-94. doi: 10.1016/j.advenzreg.2007.11.012.
382. Thompson LU, Button CL, Jenkins DJ. Phytic acid and calcium affect the in vitro rate of navy bean starch digestion and blood glucose response in humans. *Am J Clin Nutr.* 1987; 46(3): 467-73. doi: 10.1093/ajcn/46.3.467.
383. Foster SR, Omoruyi FO, Bustamante J, Lindo RL, Dilworth LL. The effect of combined inositol hexakisphosphate and inositol supplement in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Int J Exp Pathol.* 2016; 97(5): 397-407. doi: 10.1111/iep.12210.
384. Kim JN, Han SN, Kim HK. Phytic acid and myo-inositol support adipocyte differentiation and improve insulin sensitivity in 3T3-L1 cells. *Nutr Res.* 2014; 34(8): 723-31. doi: 10.1016/j.nutres.2014.07.015.
385. Høy M, Efanov AM, Bertorello AM, Zaitsev SV, Olsen HL, Bokvist K, et al. Inositol hexakisphosphate promotes dynamin I- mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(10): 6773-7. doi: 10.1073/pnas.102157499.
386. Efanov AM, Zaitsev SV, Berggren PO. Inositol hexakisphosphate stimulates non-Ca²⁺-mediated and primes Ca²⁺-mediated exocytosis of insulin by activation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(9): 4435-9. doi: 10.1073/pnas.94.9.4435.
387. Shamsuddin AK, Bose S. IP6 (Inositol Hexaphosphate) as a Signaling Molecule. *Curr. Cancer Rev.* 2012; 7: 289–304. doi: 10.2174/157436212802481628.
388. Eagle H, Oyama VI, Levy M, Freeman A. Myo-inositol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture. *Science.* 1956; 123(3202): 845-7. doi: 10.1126/science.123.3202.845-a.

389. Chau JF, Lee MK, Law JW, Chung SK, Chung SS. Sodium/myo-inositol cotransporter-1 is essential for the development and function of the peripheral nerves. *FASEB J.* 2005; 19(13): 1887-9. doi: 10.1096/fj.05-4192fje.
390. Dai Z, Chung SK, Miao D, Lau KS, Chan AW, Kung AW. Sodium/myo-inositol cotransporter 1 and myo-inositol are essential for osteogenesis and bone formation. *J Bone Miner Res.* 2011; 26(3): 582-90. doi: 10.1002/jbmr.240.
391. Carlomagno G, Nordio M, Chiu TT, Unfer V. Contribution of myo-inositol and melatonin to human reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011; 159(2): 267-72. doi: 10.1016/j.ejogrb.2011.07.038.
392. Baillargeon JP, Nestler JE. Commentary: polycystic ovary syndrome: a syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin? *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(1): 22-4. doi: 10.1210/jc.2005-1804.
393. Gerli S, Mignosa M, Di Renzo GC. Effects of inositol on ovarian function and metabolic factors in women with PCOS: a randomized double blind placebo-controlled trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2003; 7(6): 151-9.
394. Gerli S, Papaleo E, Ferrari A, Di Renzo GC. Randomized, double blind placebo-controlled trial: effects of myo-inositol on ovarian function and metabolic factors in women with PCOS. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2007; 11(5): 347-54.
395. Papaleo E, Unfer V, Baillargeon JP, De Santis L, Fusi F, Brigante C, et al. Myo-inositol in patients with polycystic ovary syndrome: a novel method for ovulation induction. *Gynecol Endocrinol.* 2007; 23(12): 700-3. doi: 10.1080/09513590701672405.
396. Genazzani AD, Lanzoni C, Ricchieri F, Jasonni VM. Myo-inositol administration positively affects hyperinsulinemia and hormonal parameters in overweight patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2008; 24(3): 139-44.
397. Ciotta L, Stracquadanio M, Pagano I, Carbonaro A, Palumbo M, Gulino F. Effects of myo-inositol supplementation on oocyte's quality in PCOS patients: a double blind trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011; 15(5): 509-14.
398. Cheang KI, Baillargeon JP, Essah PA, Ostlund REJ, Apridonize T, Islam L, et al. Insulin-stimulated release of D-chiro-inositol-containing inositolphosphoglycan mediator correlates with insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism.* 2008 Oct;57(10):1390-7.
399. Condorelli RA, La Vignera S, Bellanca S, Vicari E, Calogero AE. Myoinositol: does it improve sperm mitochondrial function and sperm motility? *Urology.* 2012; 79(6): 1290-5. doi: 10.1016/j.urology.2012.03.005.
400. Condorelli RA, La Vignera S, Di Bari F, Unfer V, Calogero AE. Effects of myoinositol on sperm mitochondrial function in-vitro. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011; 15(2): 129-34.
401. Baldassarre MPA, Di Tomo P, Centorame G, Pandolfi A, Di Pietro N, Consoli A, et al. Myoinositol Reduces Inflammation and Oxidative Stress in Human Endothelial Cells Exposed In Vivo to Chronic Hyperglycemia. *Nutrients.* 2021 Jun;13(7).
402. Paparo SR, Ferrari SM, Patrizio A, Elia G, Ragusa F, Botrini C, et al. Myoinositol in Autoimmune Thyroiditis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:930756.

403. Dinicola S, Unfer V, Facchinetti F, Soulage CO, Greene ND, Bizzarri M, et al. Inositols: From Established Knowledge to Novel Approaches. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(19): 10575. doi: 10.3390/ijms221910575.
404. Chhetri DR. Myo-Inositol and Its Derivatives: Their Emerging Role in the Treatment of Human Diseases. *Front Pharmacol.* 2019; 10: 1172. doi: 10.3389/fphar.2019.01172.
405. Bizzarri M, Fuso A, Dinicola S, Cucina A, Bevilacqua A. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of inositol(s) in health and disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016; 12(10): 1181-96. doi: 10.1080/17425255.2016.1206887.
406. De Felice FG, Vieira MN, Bomfim TR, Decker H, Velasco PT, Lambert MP, et al. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106(6):1971-1976.
407. Chong ZZ, Li F, Maiese K. Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury. *Histol Histopathol.* 2005 Jan;20(1):299–315.
408. Kim AR, Zou YN, Park TH, Shim KH, Kim MS, Kim ND, et al. Active components from *Artemisia iwayomogi* displaying ONOO(-) scavenging activity. *Phytother Res.* 2004; 18(1): 1-7. doi: 10.1002/ptr.1358.
409. Rengarajan T, Rajendran P, Nandakumar N, Balasubramanian MP, Nishigaki I. Free radical scavenging and antioxidant activity of D-pinitol against 7, 12 dimethylbenz (a) anthracene induced breast cancer in sprague dawley rats. *Asian Pac J Trop Dis.* 2014;4(5):384–90.
410. Nascimento NRF, Lessa LMA, Kerntopf MR, Sousa CM, Alves RS, Queiroz MGR, et al. Inositols prevent and reverse endothelial dysfunction in diabetic rat and rabbit vasculature metabolically and by scavenging superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan;103(1):218–23.
411. Jiang WD, Wu P, Kuang SY, Liu Y, Jiang J, Hu K, et al. Myo-inositol prevents copper-induced oxidative damage and changes in antioxidant capacity in various organs and the enterocytes of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquat Toxicol.* 2011 Oct;105(3–4):543–51.
412. Jiang WD, Feng L, Liu Y, Jiang J, Zhou XQ. Myo-inositol prevents oxidative damage, inhibits oxygen radical generation and increases antioxidant enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquac. Res.* 2009; 40: 1770–1776.
413. Vasaikar N, Mahajan U, Patil KR, Suchal K, Patil CR, Ojha S, Goyal SN. D-pinitol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: Impact on pro-inflammatory cytokines. *Chem Biol Interact.* 2018; 290: 6-11. doi: 10.1016/j.cbi.2018.05.003.
414. Lindstedt G. Constituents of pine heartwood. XIV. The heartwood of *Pinus monticola* dougl. *Acta Chem Scand.* 1949; 3: 1147–1152. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.03-1147>.
415. Nasar-Abbas SM, E-Huma Z, Vu TH, Khan MK, Esbenshade H, Jayasena V. Carob Kibble: A Bioactive-Rich Food Ingredient. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2016; 15(1): 63-72. doi: 10.1111/1541-4337.12177.

416. Tetik N, Yüksel E. Ultrasound-assisted extraction of D-pinitol from carob pods using Response Surface Methodology. *Ultrason Sonochem.* 2014; 21(2): 860-5. doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.09.008.
417. López-Sánchez JI, Moreno D, García-Viguer 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(1): 41-63.
418. Ley SV, Sternfeld F, Taylor S. Microbial oxidation in synthesis: A six step preparation of (+)-Pinitol from benzene. *Tetrahedron Lett.* 1987; 28(2): 225-226. doi: 10.1016/S0040-4039(00)95692-2.
419. Ley SV, Sternfeld F. Microbial oxidation in synthesis: Preparation of (+)-and (-)-pinitol from benzene. *Tetrahedron.* 1989; 45(11): 3463-3476. doi: 10.1016/S0040-4020(01)81025-5.
420. Hudlicky T, Price JD, Rulin F, Tsunoda T. Efficient and enantiodivergent synthesis of (+)- and (-)-pinitol. *J Am Chem Soc.* 1990; 112: 9439-9440. doi: 10.1021/ja00181a081.
421. Hudlicky T, Rulin F, Tsunoda T, Luna H, Andersen C, Price JD. Biocatalysis as a rational approach to enantiodivergent synthesis of highly oxygenated compounds: (+)-and (-)-Pinitol and Other Cyclitols. *Isr J Chem.* 1991; 31(3): 229-238.
422. Aceña JL, Arjona O, Plumet J. Total synthesis of (+)-pinitol. *Tetrahedron: Asymmetry.* 1996; 7 (12): 3535-3544. doi: 10.1016/S0957-4166(96)00461-2.
423. 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>.
424. Sethi G, Ahn KS, Sung B, Aggarwal BB. Pinitol targets nuclear factor-kappaB activation pathway leading to inhibition of gene products associated with proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7(6): 1604-14.
425. Ghogar A, Jiraungkoorskul W. Antifertility Effect of Bougainvillea spectabilis or Paper Flower. *Pharmacogn Rev.* 2017; 11(21): 19-22. doi: 10.4103/phrev.phrev_44_16.
426. Jawla S, Kumar Y, Khan MS. Hypoglycemia activity of Bougainvillea spectabilis stem bark in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2: 919-23.
427. Narayanan CR, Joshi DD, Mujumdar AM. Hypoglycemic action of Bougainvillea spectabilis leaves. *Curr Sci.* 1984; 53: 579-81.
428. Butterfield DA, Di Domenico F, Barone E. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: a key role for oxidative stress in brain. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842(9): 1693-706. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.010.
429. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 761264. doi: 10.1155/2014/761264.

430. Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, Mikolajczyk TP. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol*. 2019; 70(6). doi: 10.26402/jpp.2019.6.01.
431. Sivakumar S, Subramanian SP. D-pinitol attenuates the impaired activities of hepatic key enzymes in carbohydrate metabolism of streptozotocin-induced diabetic rats. *Gen Physiol Biophys*. 2009; 28(3): 233-41. doi: 10.4149/gpb_2009_03_233.
432. Sivakumar S, Subramanian SP. Pancreatic tissue protective nature of D-Pinitol studied in streptozotocin-mediated oxidative stress in experimental diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2009; 622(1-3): 65-70. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.09.021.
433. Sivakumar S, Palsamy P, Subramanian SP. Attenuation of oxidative stress and alteration of hepatic tissue ultrastructure by D-pinitol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Res*. 2010;44(6):668–78.
434. Sivakumar S, Palsamy P, Subramanian SP. Impact of d-pinitol on the attenuation of proinflammatory cytokines, hyperglycemia-mediated oxidative stress and protection of kidney tissue ultrastructure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2010;188(1):237–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.014>
435. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015; 70: 5.47.1-5.47.20. doi: 10.1002/0471141755.ph0547s70.
436. Choi MS, Lee MK, Jung UJ, Kim HJ, Do GM, Park YB, Jeon SM. Metabolic response of soy pinitol on lipid-lowering, antioxidant and hepatoprotective action in hamsters fed-high fat and high cholesterol diet. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53(6): 751-9.
437. Choi MS, Lee WH, Kwon EY, Kang MA, Lee MK, Park YB, Jeon SM. Effects of soy pinitol on the pro-inflammatory cytokines and scavenger receptors in oxidized low-density lipoprotein-treated THP-1 macrophages. *J Med Food*. 2007; 10(4): 594-601.
438. Zhou Y, Park CM, Cho CW, Song YS. Protective effect of pinitol against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats fed on a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72(7): 1657-66. doi: 10.1271/bbb.70473.
439. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017; 9(6): 7204-7218. doi: 10.18632/oncotarget.23208.
440. Tóbon-Velasco JC, Cuevas E, Torres-Ramos MA. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF-kB pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014; 13(9): 1615-26. doi: 10.2174/1871527313666140806144831.
441. Kumar J, Haldar C, Verma R. Melatonin Ameliorates LPS-Induced Testicular Nitro-oxidative Stress (iNOS/TNF α) and Inflammation (NF-kB/COX-2) via Modulation of SIRT-1. *Reprod Sci*. 2021; 28(12): 3417-3430. doi: 10.1007/s43032-021-00597-0.
442. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(11): 1603-16. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.

443. Kim JC, Shin JY, Shin DH, Kim SH, Park SH, Park RD, et al. Synergistic antiinflammatory effects of pinitol and glucosamine in rats. *Phytotherapy Research*. 2005;19(12):1048–51.
444. Singh RK, Pandey BL, Tripathi M, Pandey VB. Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol. *Fitoterapia*. 2001; 72(2): 168-70. doi: 10.1016/s0367-326x(00)00267-7.
445. Zheng K, Zhao Z, Lin N, Wu Y, Xu Y, Zhang W. Protective Effect of Pinitol Against Inflammatory Mediators of Rheumatoid Arthritis via Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 22 (PTPN22). *Med Sci Monit*. 2017; 23: 1923-1932.
446. Bhat KA, Shah BA, Gupta KK, Pandey A, Bani S, Taneja SC. Semi-synthetic analogs of pinitol as potential inhibitors of TNF-alpha cytokine expression in human neutrophils. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009; 19(7): 1939-43. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.02.050.
447. Chauhan PS, Gupta KK, Bani S. The immunosuppressive effects of *Agyrolobium roseum* and pinitol in experimental animals. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11(2): 286-91. doi: 10.1016/j.intimp.2010.11.028.
448. Lee JS, Lee CM, Jeong YI, Jung ID, Kim BH, Seong EY. d-pinitol regulates Th1/ Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. *FEBS Lett*. 2007; 581(1): 57-64. [https:// doi.org/10.1016/j.febslet.2006.11.077](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.11.077).
449. Lee JS, Jung ID, Jeong YI, Lee CM, Shin YK, Lee SY, et al. D-Pinitol inhibits Th1 polarization via the suppression of dendritic cells. *Int Immunopharmacol*. 2007; 7(6): 791-804. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.01.018>.
450. Heo JC, Lee SH, Hwang YH. Extract of immuno-suppressive activities of pinitol isolated from soybean. Korean patent KR 20110116627(A), 2011.
451. Yun YC, Choi CM, Jeon YJ. Composition for preventing and treating inflammatory disease comprising glucosamine and Pinitol. Korean patent KR 20070002401(A), 2007.
452. Lin TH, Tan TW, Tsai TH, Chen CC, Hsieh TF, Lee SS, et al. D-pinitol inhibits prostate cancer metastasis through inhibition of $\alpha V\beta 3$ integrin by modulating FAK, c-Src and NF- κB pathways. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(5): 9790-802. doi: 10.3390/ijms14059790.
453. Rengarajan T, Nandakumar N, Balasubramanian MP. D-Pinitol prevents rat breast carcinogenesis induced by 7, 12 -Dimethylbenz [a] anthracene through inhibition of Bcl-2 and induction of p53, caspase-3 proteins and modulation of hepatic biotransformation enzymes and antioxidants. *Biomedicine \& Preventive Nutrition [Internet]*. 2013;3:31–41. Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:83970700>
454. Kim YS, Park JS, Kim MJ, et al. Inhibitory Effect of D-pinitol on Both Growth and Recurrence of Breast Tumor from MDA-MB-231 Cancer Cells. *Korean J Pharmacogn*. 2014; 45(2) 174-180.
455. Rengarajan T, Nandakumar N, Rajendran P, Haribabu L, Nishigaki I, Balasubramanian MP. D-pinitol promotes apoptosis in MCF-7 cells via induction of p53 and Bax and inhibition of Bcl-2 and NF- κB . *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(4): 1757-62.
456. Rengarajan T, Nandakumar N, Rajendran P, Ganesh MK, Balasubramanian MP, Nishigaki I. D-pinitol mitigates tumor growth by modulating interleukins and hormones

and induces apoptosis in rat breast carcinogenesis through inhibition of NF- κ B. *J Physiol Biochem.* 2015 Jun;71(2):191–204.

457. Rengarajan T, Nandakumar N, Balasubramanian M. Protective efficacy of dietary D-pinitol on hepatic and renal tissues during experimental breast cancer in rats challenged with 7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene: A biochemical approach. *Biomed Aging Pathol.* 2012; 2(3): 85-93.
458. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005; 446(5): 475-82. doi: 10.1007/s00428-005-1264-9.
459. Jayasooriya R, Kang C, Park S, Choi Y, Kim G. Pinitol suppresses tumor necrosis factor- α -induced invasion of prostate cancer LNCaP cells by inhibiting nuclear factor- κ B-Mediated matrix metalloproteinase-9 expression. *Trop J Pharm Res.* 2015; 14(8): 1357-1364. doi: 10.4314/tjpr.v14i8.6.
460. Lechertier T, Hodivala-Dilke K. Focal adhesion kinase and tumour angiogenesis. *J Pathol.* 2012; 226(2): 404-12. doi: 10.1002/path.3018.
461. Song SG, Park JS, Kim YS. Use of pinitol and D-chiro inositol in cancer treatment and prevention of cancer relapse. Korean patent KR 20150088589(A), 2015.
462. Srivastava M, Deal C. Osteoporosis in elderly: prevention and treatment. *Clin Geriatr Med.* 2002; 18(3): 529-55. doi: 10.1016/s0749-0690(02)00022-8.
463. Goltzman D. Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1(10): 784-96. doi: 10.1038/nrd916.
464. Liu SC, Chuang SM, Tang CH. D-pinitol inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Int Immunopharmacol.* 2012; 12(3): 494-500. doi: 10.1016/j.intimp.2012.01.002.
465. Jaerang R, Hyeon-Koon M, Chang SP. Composition for prevention or treatment of bone metabolism disorder comprising d-pinitol as an active ingredient. Chinese patent CN 101808628(A), 2010.
466. Shin YC, Jeon YJ, Kim JJ. Use of pinitol or chiroinositol for protecting the liver. United States patent US 2007098826(A1), 2007.
467. Kodani N, Nakae J. Tissue-Specific Metabolic Regulation of FOXO-Binding Protein: FOXO Does Not Act Alone. *Cells* [Internet]. 2020;9(3). Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/3/702>
468. Green CL, Lamming DW, Fontana L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022; 23(1): 56-73. doi: 10.1038/s41580-021-00411-4.
469. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science.* 2010; 328(5976): 321-6. doi: 10.1126/science.1172539.
470. Hada B, Yoo MR, Seong KM, Jin YW, Myeong HK, Min KJ. D-chiro-inositol and pinitol extend the life span of *Drosophila melanogaster*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013; 68(3): 226-34. doi: 10.1093/gerona/gls156.

471. Moskalev A, Guvatova Z, Lopes IA, Beckett CW, Kennedy BK, De Magalhaes JP, Makarov AA. Targeting aging mechanisms: pharmacological perspectives. *Trends Endocrinol Metab.* 2022; 33(4): 266-280. doi: 10.1016/j.tem.2022.01.007.
472. Ishida M, Suzuki T, Tsuji A. Biological clock adjusting agent. Japanese patent JP 2015140305(A), 2015.
473. Choi SK, Park KD, Kim DA, et al. Preparation method for *Ceratonia siliqua* fruit extract and cosmetic composition for anti-aging comprising the same. Korean patent KR 101339915(B1), 2013.
474. Choi SK, Park KD, Kim DA, et al. Cosmetic composition for anti-aging comprising *Ceratonia siliqua* fruit extract. Korean patent KR 20150060004(A), 2015.
475. Bhat M, Kothiwale SK, Tirmale AR, Bhargava SY, Joshi BN. Antidiabetic Properties of *Azadiracta indica* and *Bougainvillea spectabilis*: In Vivo Studies in Murine Diabetes Model. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011: 561625. doi: 10.1093/ecam/nep033.
476. van Wyk BE, Albrecht C. A review of the taxonomy, ethnobotany, chemistry and pharmacology of *Sutherlandia frutescens* (Fabaceae). *J Ethnopharmacol.* 2008; 119(3): 620-9. doi: 10.1016/j.jep.2008.08.003.
477. Chadwick WA, Roux S, van de Venter M, Louw J, Oelofsen W. Anti-diabetic effects of *Sutherlandia frutescens* in Wistar rats fed a diabetogenic diet. *J Ethnopharmacol.* 2007; 109(1): 121-7. doi: 10.1016/j.jep.2006.07.012.
478. Lahuta LB, Szablińska J, Ciak M, Górecki RJ. The occurrence and accumulation of D-pinitol in fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). *Acta Physiol Plant.* 2018; 40, 155. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2734-4>.
479. León-González AJ, Navarro I, Acero N, Mingarro DM, Martín-Cordero C. Genus *Retama*: a review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities. *Phytochem Rev.* 2018; 17: 701–731. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9555-3>.
480. Do GM, Choi MS, Kim HJ, Woo MN, Lee MK, Jeon SM. Soy pinitol acts partly as an insulin sensitizer or insulin mediator in 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Nutr.* 2008; 2(4): 359-64. doi: 10.1007/s12263-007-0071-0.
481. Kang MJ, Kim JI, Yoon SY, Kim JC, Cha IJ. Pinitol from soybeans reduces postprandial blood glucose in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Food.* 2006;9(2):182–6.
482. Bañuls C, Rovira-Llopis S, López-Doménech S, Veses S, Víctor VM, Rocha M, et al. Effect of consumption of a carob pod inositol-enriched beverage on insulin sensitivity and inflammation in middle-aged prediabetic subjects. *Food Funct* [Internet]. 2016;7(10):4379—4387. Available from: <https://doi.org/10.1039/c6fo01021k>
483. Lambert C, Cubedo J, Padró T, Vilahur G, López-Bernal S, Rocha M, et al. Effects of a Carob-Pod-Derived Sweetener on Glucose Metabolism. *Nutrients.* 2018; 10(3): 271. doi: 10.3390/nu10030271.
484. Moreira LN, Silva JF, Silva GC, Lemos VS, Cortes SF. Activation of eNOS by D-pinitol Induces an Endothelium-Dependent Vasodilatation in Mouse Mesenteric Artery. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 528. doi: 10.3389/fphar.2018.00528.

485. Martin-Lomas M, Rademacher TW, Caro HN, Francois I. Inositolglycans and their uses. Worldwide patent WO 2001085740(A2), 2001.
486. Ostlund RE, Sherman WR. Pinitol and derivatives thereof for the treatment of metabolic disorders. United States patent US 5827896(A), 1998.
487. Larner J, Price J, Picariello T, Huang L. Method of treating defective glucose metabolism using synthetic insulin substances. United States patent US 5652221(A), 1997.
488. Koon MH. Combination of pinitol and drug for treating diabetes mellitus. Korean patent KR 20130017859(A), 2013.
489. Koon MH. Combination of pinitol and natural product for treating diabetes mellitus. Korean patent KR 101792834(B1), 2017.
490. Greenwood M, Kreider RB, RasMussen C, Almada AL, Earnest CP. D-pinitol augments whole body creatine retention in man. *J Exerc Physiol Online*. 2001; 4(4): 41-47.
491. Kerkick CM, Wilborn CD, Campbell WI, Harvey TM, Marcello BM, Roberts MD, et al. The effects of creatine monohydrate supplementation with and without D-pinitol on resistance training adaptations. *J Strength Cond Res*. 2009; 23(9): 2673-82.
492. Cooper R, Naclerio F, Allgrove J, Jimenez A. Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *J Int Soc Sports Nutr*. 2012; 9(1): 33. doi: 10.1186/1550-2783-9-33.
493. Dykstra JC. A combination of pinitol and creatine to enhance uptake and retention of creatine. Worldwide patent WO 0180853(A1), 2001.
494. Dykstra JC. A combination of pinitol and creatine to enhance uptake and retention of creatine. United States patent US 2003212134(A1), 2003.
495. Heuer M, Clement K, Chaudhuri S. Composition and method for enhancing or promoting the activity of insulin, enhancing skeletal muscle growth, reducing skeletal muscle loss, and increasing the energy supply to skeletal muscle. Worldwide patent WO 2008025116(A1), 2008.
496. Folch J, Petrov D, Ettcheto M, Abad S, Sánchez-López E, García ML, et al. Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment. *Neural Plast*. 2016; 2016:8501693. doi: 10.1155/2016/8501693.
497. Pasinetti GM. Compositions and methods for treating Alzheimer's disease and related disorders and promoting a healthy nervous system. United States patent US 2013/0123370(A1), 2013.
498. Rodríguez De Fonseca F, Navarro JA, Baixeras E, Decara JM, Medina D, Lopez-Gamero AJ, et al. Composition and methods for enhancing or promoting the secretion of ghrelin to promote a healthy metabolic aging. European patent EP 3789018(A1), 2021.
499. Tan RX, Lu H, Wolfender JL, Yu TT, Zheng WF, Yang L, Gafner S, Hostettmann K. Mono- and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species. *Planta Med*. 1999; 65(1): 64-7. doi: 10.1055/s-1999-13965.

500. Zhan TR, Ma YD, Fan PH, Ji M, Lou HX. Synthesis of 4/5-deoxy-4/5-nucleobase derivatives of 3-O-methyl-D-chiro-inositol as potential antiviral agents. *Chem Biodivers*. 2006; 3(10): 1126-37. doi: 10.1002/cbdv.200690114.
501. Alonso-Castro AJ, Zapata-Morales JR, Arana-Argáez V, Torres-Romero JC, Ramírez-Villanueva E, Pérez-Medina SE, et al. Pharmacological and toxicological study of a chemical-standardized ethanol extract of the branches and leaves from *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. (Fabaceae). *J Ethnopharmacol*. 2018 Oct;224:314–22.
502. Halim M, Halim A. The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes). *Diabetes Metab Syndr*. 2019; 13(2): 1165-1172. doi: 10.1016/j.dsx.2019.01.040.
503. Rahn S, Zimmermann V, Viol F, Knaack H, Stemmer K, Peters L, et al. Diabetes as risk factor for pancreatic cancer: Hyperglycemia promotes epithelial-mesenchymal-transition and stem cell properties in pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Lett*. 2018 Feb;415:129–50.
504. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol*. 2019; 10(1): 10-27. doi: 10.14740/wjon1166.
505. Bizzarri M, Carlomagno G. Inositol: history of an effective therapy for Polycystic Ovary Syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014 Jul;18(13):1896–903.
506. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010 Jun;8(6):e1000412.
507. Decara JM, Pavón FJ, Suárez J, Romero-Cuevas M, Baixeras E, Vázquez M, et al. Treatment with a novel oleic-acid-dihydroxyamphetamine conjugation ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in obese Zucker rats. *Dis Model Mech*. 2015 Oct;8(10):1213–25.
508. BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959 Aug;37(8):911–7.
509. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611–22.
510. Decara J, Serrano A, Pavón FJ, Rivera P, Arco R, Gavito A, et al. The adiponectin promoter activator NP-1 induces high levels of circulating TNF α and weight loss in obese (fa/fa) Zucker rats. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–14.
511. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
512. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412–9.
513. USDHHS, FDA, CDER. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation; U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for

Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM): Laurel, MD, USA, 2018.

514. Sharma N, Verma MK, Gupta DK, Satti NK, Khajuria RK. Isolation and quantification of pinitol in *Argyrobolium roseum* plant, by ¹H-NMR. *Journal of Saudi Chemical Society* [Internet]. 2016;20(1):81–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610314000933>
515. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed* [Internet]. 2010;99(3):306–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>
516. Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P. Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinology*. 2004;145(2):667–78.
517. Kim MJ, Yoo KH, Kim JH, Seo YT, Ha BW, Kho JH, et al. Effect of pinitol on glucose metabolism and adipocytokines in uncontrolled type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77(3 SUPPL.).
518. Geethan PKMA, Prince PSM. Antihyperlipidemic effect of D-pinitol on streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2008;22(4):220–4.
519. Kim HJ, Park KS, Lee SK, Min KW, Han KA, Kim YK, et al. Effects of pinitol on glycemic control, insulin resistance and adipocytokine levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Nutr Metab*. 2012;60(1):1–5.
520. Janah L, Kjeldsen S, Galsgaard KD, Winther-Sørensen M, Stojanovska E, Pedersen J, et al. Glucagon receptor signaling and glucagon resistance. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
521. Noguchi T, Inoue H, Tanaka T. Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase in diabetic rat liver by insulin and dietary fructose. *Journal of Biological Chemistry*. 1985;260(26):14393–7.
522. Decaux JF, Antoine B, Kahn A. Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(20):11584–90.
523. El-Maghrabi MR, Haston WS, Flockhart DA, Claus TH, Pilkis SJ. Studies on the phosphorylation and dephosphorylation of L-type pyruvate kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1980;255(2):668–75.
524. Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B. Insulin activates 6-phosphofructo-2-kinase and pyruvate kinase in the liver. Indirect evidence for an action via a phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(13):7202–6.
525. Yamada K, Noguchi T. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochemical Journal*. 1999;337(1):1–11.
526. Atcha Z, Chen WS, Ong AB, Wong FK, Neo A, Browne ER, et al. Cognitive enhancing effects of ghrelin receptor agonists. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009 Oct;206(3):415–27.

527. Mani BK, Shankar K, Zigman JM. Ghrelin's Relationship to Blood Glucose. *Endocrinology*. 2019 May;160(5):1247–61.
528. Galsgaard KD, Pedersen J, Knop FK, Holst JJ, Wewer Albrechtsen NJ. Glucagon Receptor Signaling and Lipid Metabolism. *Front Physiol*. 2019;10:413.
529. Wang N, Li Q, Han B, Chen Y, Zhu C, Chen Y, et al. Follicle-stimulating hormone is associated with non-alcoholic fatty liver disease in Chinese women over 55 years old. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016 Jun;31(6):1196–202.
530. Narayanan C. R, Joshi DD, Mujumdar AM, Dhekne V. Pinitol — a new anti-diabetic compound from the leaves of *Bougainvillea spectabilis*. *Curr Sci*. 1987;56:139–41.
531. Carrera-Lanestosa A, Moguel-Ordóñez Y, Segura-Campos M. *Stevia rebaudiana* Bertoni: A Natural Alternative for Treating Diseases Associated with Metabolic Syndrome. *J Med Food*. 2017 Oct;20(10):933–43.
532. Richter MM, Galsgaard KD, Elmelund E, Knop FK, Suppli MP, Holst JJ, et al. The Liver- α -Cell Axis in Health and in Disease. *Diabetes*. 2022 Sep;71(9):1852–61.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

