

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

**DTO. BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y FISIOLÓGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOTECNOLOGÍA AVANZADA**

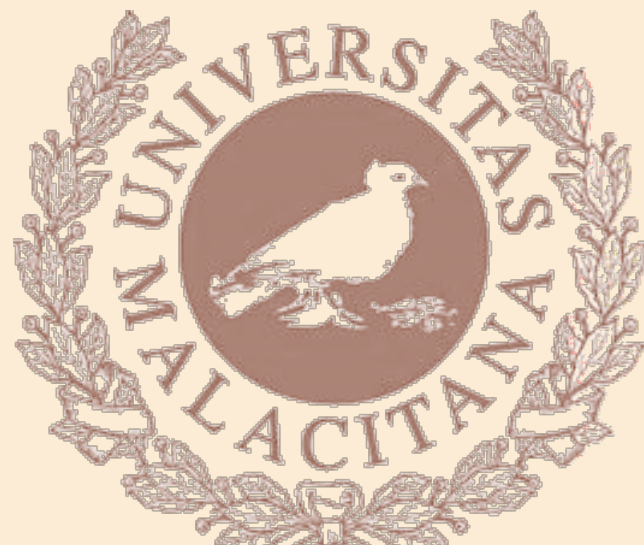


TESIS DOCTORAL

**Estudio de la eficacia de la administración
dietética del D-Chiro-inositol en la
señalización de insulina, neuroinflamación y
alteraciones metabólicas en un modelo
animal de la enfermedad de Alzheimer**

Antonio Jesús López Gambero


Málaga, 2022





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Antonio Jesús López Gambero

 <https://orcid.org/0000-0001-7716-9056>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

<http://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





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



PROGRAMA DE
DOCTORADO
BIOTECNOLOGÍA
AVANZADA

Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Área de Fisiología,
Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

Estudio de la eficacia de la administración dietética del D-Chiro-inositol en la señalización de insulina, neuroinflamación y alteraciones metabólicas en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer

Antonio Jesús López Gambero

Tutor:

Manuel Cifuentes Rueda

Directores:

Juan Suárez Pérez

Patricia Rivera González

Málaga, 2022





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



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

D./Dña ANTONIO JESÚS LÓPEZ GAMBERO

Estudiante del programa de doctorado BIOTECNOLOGÍA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LA ADMINISTRACIÓN DIETÉTICA DEL D-CHIRO-INOSITOL EN LA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA, NEUROINFLAMACIÓN Y ALTERACIONES METABÓLICAS EN UN MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Realizada bajo la tutorización de MANUEL CIFUENTES RUEDA y dirección de JUAN SUÁREZ PEREZ E PATRICIA RIVERA GONZÁLEZ (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

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 10 de OCTUBRE de 2022

| | |
|--|--|
| | |
|--|--|





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dr. D. Juan Suárez Pérez

Profesor Contratado Doctor del Área de Medicina Legal y Forense de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

Dra. D^a. Patricia Rivera González

Investigadora Contratada Doctora del Programa “Miguel Servet” (ISCIII) del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (Unidad Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga).

Dr. D. Manuel Cifuentes Rueda

Catedrático de Universidad del Área de Fisiología del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

CERTIFICAN que D. Antonio Jesús López Gambero

ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra tutela y dirección los datos necesarios para la realización de una Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones, titulada: “ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LA ADMINISTRACIÓN DIETÉTICA DEL D-CHIRO-INOSITOL EN LA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA, NEUROINFLAMACIÓN Y ALTERACIONES METABÓLICAS EN UN MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”, que consideramos que las 3 publicaciones aportadas tienen el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar al Grado de Doctor con Mención Internacional.

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

En Málaga, a 10 de octubre de 2022

Directores:

Tutor: Manuel Cifuentes Rueda



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dr. D. Juan Suárez Pérez

Profesor Contratado Doctor del Área de Medicina Legal y Forense de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

Dra. D^a. Patricia Rivera González

Investigadora Contratada Doctora del Programa "Miguel Servet" (ISCIII) del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (Unidad Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga).

CERTIFICAN que

las 3 publicaciones científicas que avalan la Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones presentada por D. **Antonio Jesús López Gambero** y titulada: "ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LA ADMINISTRACIÓN DIETÉTICA DEL D-CHIRO-INOSITOL EN LA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA, NEUROINFLAMACIÓN Y ALTERACIONES METABÓLICAS EN UN MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER", no han sido utilizadas en Tesis anteriores.

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

En Málaga, a 10 de octubre de 2022

Directores:



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

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

- Proyecto: Diseño, ingeniería y ensamblaje de línea piloto de nuevos extractos naturales solvent free y validación in vivo de compuestos bioactivos. Entidad financiadora: Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Gobierno de España. Referencia: RTC-2016-4983-1. Duración: 2016-2019.
- Proyecto: FATZHEIMER. Entidad financiadora: Fondo Europeo de Desarrollo Regional- Unión Europea (FEDER-UE) y EULAC-HEALTH H2020. Referencia: EU-LACH16/T010131. Duración: 2018-2022.
- Proyecto: Role of mitochondrial cannabinoid type 1 receptor in hypothalamic circuits and its interaction with mTORC1 pathway during obesity. – MitObesity. Entidad financiadora: Agence Nationale de la Recherche. Referencia: ANR-18-CE14-0029. Duración: 2019-2022.
- Proyecto: Validación preclínica de los inosítoles de la algarroba sobre trastornos asociados a la resistencia insulínica. Entidad financiadora: Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades, Junta de Andalucía. Referencia: P18-TP-5194. Duración: 2020-2022.
- Proyecto: Obtención de principios activos antioxidantes a partir de la vaina del algarrobo y validación de su potencial terapéutico. Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España. Referencia: RTC-2019- 007329-1. Duración: 2020-2023.

D. Antonio Jesús López Gambero ha disfrutado durante el desarrollo de su Tesis Doctoral de los siguientes contratos de investigación:

- Contrato “i-PFIS: doctorados IIS-empresa en ciencias y tecnologías de la salud”, convocatoria 2018. Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Referencia: IFI18/00042. Duración: 2019-2022.
- Ayuda para la movilidad de personal investigador contratado en el marco de la AES (M-AES), convocatoria 2021. Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Referencia: MV21/00038. Duración: 90 días (2022).

D. Antonio Jesús López Gambero ha realizado dos estancias de investigación durante el desarrollo de tu Tesis Doctoral:

- Estancia de investigación en la empresa Euronutra S.L. desde el 1 de mayo de 2021 hasta el 31 de enero de 2022 y desde el 2 de mayo de 2022 hasta el 1 de agosto de 2022. Esta estancia forma parte del fortalecimiento de la investigación Empresa-Institutos de Salud, por la que se fomenta la inserción del doctorando en un ambiente industrial y la capacidad traslacional de la investigación en empresas de biotecnología al ámbito de la salud.
- Estancia de investigación en el Neurocentre Magendie (U1215), perteneciente al Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) y a la Universidad de Burdeos, Francia, desde el 1 de febrero de 2022 hasta el 1 de mayo de 2022. Es esta estancia fue tutorizado por la Dra. Daniela Cota y permitió generar resultados incluidos en el tercer artículo publicado en el compendio de artículos de esta Tesis Doctoral.

Esta tesis doctoral en compendio recoge las siguientes publicaciones en las que D. Antonio Jesús López Gambero figura como autor principal:

1. **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;8(9). DOI: 10.3390/biomedicines8090295.
2. **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. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(10):5365. DOI: 10.3390/ijms22105365.
3. **López-Gambero AJ**, Pacheco-Sánchez B, Rosell-Valle C, Medina-Vera D, Navarro JA, del Mar Fernández-Arjona M, 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. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;150:112994. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112994.

Estos artículos se encuentran compilados en los **ANEXOS** de esta Tesis Doctoral.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral también se han publicado las siguientes publicaciones en las que D. Antonio Jesús López Gambero figura como primer autor o co-autor:

1. **López-Gambero AJ**, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. Energy sensors in drug addiction: A potential therapeutic target. *Addiction biology*. 2021;26(2):e12936. DOI: 10.1111/adb.12936.
2. Carmona R, Barrena S, **Lopez Gambero AJ**, Rojas A, Muñoz-Chápuli R. Epicardial cell lineages and the origin of the coronary endothelium. *The FASEB Journal*. 2020;34(4):5223-39. DOI: 10.1096/fj.201902249RR.

3. Rivera P, Vargas A, Pastor A, Boronat A, **López-Gambero AJ**, Sánchez-Marín L, Medina-Vera D, Serrano A, Pavón FJ, de la Torre R, Agirregoitia E, Lucena MI, Rodríguez de Fonseca F, Decara J, Suárez J. Differential hepatoprotective role of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors in paracetamol-induced liver injury. *British Journal of Pharmacology*. 2020;177(14):3309-26. DOI: 10.1111/bph.15051.
4. Decara J, Rivera P, **López-Gambero AJ**, Serrano A, Pavón FJ, Baixeras E, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: experimental targeting for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Frontiers in pharmacology*. 2020;11:730. DOI: 10.3389/fphar.2020.00730.
5. Medina-Vera D, Rosell-Valle C, **López-Gambero AJ**, Navarro JA, Zambrana-Infantes EN, Rivera P, et al. Imbalance of endocannabinoid/lysophosphatidylinositol receptors marks the severity of Alzheimer's disease in a preclinical model: a therapeutic opportunity. *Biology*. 2020;9(11):377. DOI: 10.3390/biology9110377.
6. Rubio L, Vargas A, Rivera P, **López-Gambero AJ**, Tovar R, Christians JK, Martín de las Heras S, Rodríguez de Fonseca F, Chowen JA, Argente J, Suárez J. Recombinant IGF-1 induces sex-specific changes in bone composition and remodeling in adult mice with Pappa2 deficiency. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(8):4048. DOI: 10.3390/ijms22084048.
7. 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, Decafra J, Rodríguez de Fonseca F. d-Pinitol promotes tau dephosphorylation through a cyclin-dependent kinase 5 regulation mechanism: A new potential approach for tauopathies? *British journal of pharmacology*. 2022. DOI: 10.1111/bph.15907.
8. 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;14(8):1594. DOI: 10.3390/pharmaceutics14081594.
9. 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;14(19):4094. DOI: 10.3390/nu14194094.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral también se han registrado la siguiente patente en la que D. Antonio Jesús López Gambero figura como co-inventor:

1. Rodríguez de Fonseca F, Navarro Galera JA, Baixeras Llanos E, Decara Del Olmo JM, Medina Vera D, **López Gambero AJ**, Suárez Pérez J, Sanjuan C. Composition for preventing and treating tauopathies. WO2021048195A9 (Patent). N.º de publicación: WO/2021/048195. Fecha de publicación: 18.03.2021. N.º de la solicitud internacional: PCT/EP2020/075180.

Puede que lo más complicado sea plasmar en palabras aquello que me desborda por dentro, pero no puedo desaprovechar esta oportunidad para agradecer a todos los que me han acompañado durante este camino. Este trabajo es de todos.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor, Manuel, por su ayuda inestimable e incuantificable, por ser una guía y estar siempre dispuesto a aconsejarme cada vez que he dudado en qué pasos tomar para seguir adelante, tomara la decisión que tomara. Gracias por permitirme trabajar contigo durante el grado, máster y doctorado, gracias a ti tuve mi primera toma de contacto con un laboratorio y he podido seguir hasta hoy.

A Juan, mi director, por acogerme en este camino, por insistir conmigo desde el máster hasta que conseguimos la beca predoctoral y por preocuparte por mí y ayudarme en el presente y el futuro. Siempre has tenido paciencia y me has dedicado tiempo, algo que no puedo terminar de estimar. Son muchas horas conversando, discutiendo resultados, estadísticas. Sacas el máximo provecho de todo y todo ha sido más fácil gracias a ti. Eres mi ejemplo para seguir.

Gracias a mi directora Patricia, por siempre tener un punto de vista diferente, por darme consejos sabios y no desesperarse cuando se nos acumula el trabajo. Porque siempre me has ofrecido una mano cuando más agobiado estaba. Desde aquellas primeras charlas en el comedor hasta hoy, te estoy y estaré agradecido.

No puedo dejar de agradecerle a Fernando por abrirme las puertas de su laboratorio, por darme un proyecto, unas líneas de investigación y la libertad de desarrollarlas a través de ensayo y error y tomar mis propias decisiones. Siempre le has dado un sentido a todas las ideas que tenía en la cabeza y has sabido redirigirlas hacia lo tangible. Eres el optimismo personificado porque de otra forma, las cosas no saldrían como salen. Trabajo y unión. Eres fuente de inspiración para muchos.

Cómo no, quisiera darle también las gracias a la gente de mi “labo” en Málaga, somos un grupo tan grande que no sé por dónde acabar. Gracias a Antoñito por espabilarme desde el momento en el que puse un pie en el laboratorio, a Juan Antonio por ser el hombre más apañado del mundo, a Rubén por seguirme todas las rimas, a Marialuisa por aguantarme hasta límites insospechables, a Riccardo y Fabry porque estos italianos te dejan un hueco difícil de llenar. Gracias Cristina por guiarme en el animalario y a Dina por tantos días que nos pasamos allí. Ana, sin ti el laboratorio no estaría de una pieza. A Laura y su Gordo que lo quisimos como uno más. A todos los IP del grupo: Nuria, Elena, Javi, Toñi y las chicas del piso, Nerea y María que valen para todo. Juanito, chaval eterno, gracias por siempre tener temas de conversación interesantes, te mereces dónde has llegado. Gracias a Mar que es el vivo ejemplo de la constancia y el buen humor, A los últimos en llegar y espero que quedarse, a Bea que trabaja como nadie y le toca seguir por donde yo dejo la tesis, a Miguel siempre con ganas de saber más. Gracias a Pepe, eres enorme, a Miriam, Sonia y Carlitos, que se busca la vida como nadie. Sois maravillosos, algún día el “Mosqui” encontrará esos tubos.

Me gustaría también agradecerle a la Dra. Daniela Cota, por la estancia en su laboratorio del Neurocentre Magendie en Burdeos durante los tres meses de estancia predoctoral. En especial, gracias a todos los alumnos de máster, predoctorales y postdoctorales del Magendie, me acogisteis y me hicisteis sentir como si fuese mi casa.

No quiero dejar atrás a toda la gente del Departamento de Fisiología Animal de la Universidad de Málaga, por enseñarme y darme la oportunidad de dar prácticas y a Ana por su entusiasmo y ese cafelito que siempre me saca de mi rutina.

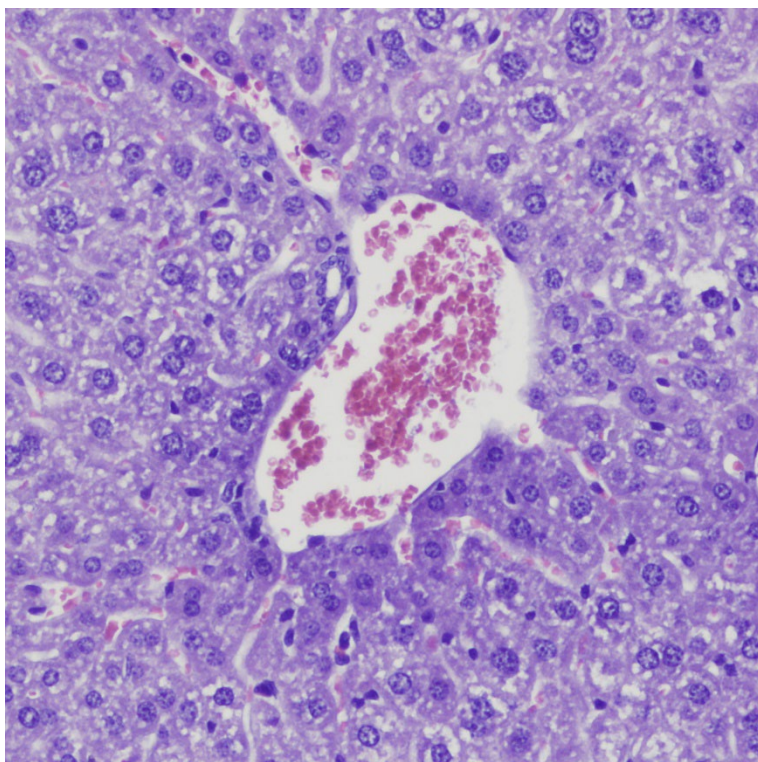
Gracias a todos y cada uno de mis amigos, a aquellas personas que en algún momento han compartido momentos cercanos conmigo. Elba y Luna, sois aquello que me saca una sonrisa cada día, porque en los momentos malos siempre he tenido a alguien a mi lado, alguien que me conoce desde los más profundo y no duda en rescatarme de mí mismo. Elba, te mereces lo mejor y por eso tienes a Luna contigo, sois eternas. Gracias a Javi, Rafa, Carlos, Adri, Juli, Juanma, Sebas, Facu y todos los del grupo, porque nos conocemos desde hace tantos años que es imposible no ser vuestro amigo, por tanto, tiempo juntos, por comprender que desaparezco durante meses absorto en mi trabajo y vuelvo como si nada hubiera pasado. Gracias a Marina por haber formado parte de este camino. Nico, me enseñaste a ir partido a partido, gracias por apoyarme, animarme y no dejar que decayese, cada día somos más fuertes y has sido como un hermano para mí.

No puedo más que agradecer a mi familia, mis hermanos y especialmente mis padres, María y José. No hay nadie en este mundo que me haya visto evolucionar como vosotros y tengo la inmensa suerte de saber qué se siente con el amor incondicional de una madre. Porque nunca habéis dudado ni un momento que pudiese lograr lo que me proponía, porque la familia no se puede escoger, pero yo os escogería a vosotros. A Píxel, porque verte cada mañana es un regalo. Eres ese caballito de Troya que vino unos días de acogida y no sabíamos que dentro escondía el ser más bonito del mundo.

“Science and everyday life cannot and should not be separated.”

Rosalind Elsie Franklin

ABREVIATURAS



4EBP: proteína de unión al factor 4E de iniciación de la traducción eucariota (*eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein*)

ABCA7: miembro 7 de la subfamilia de cassettes de unión a ATP (*ATP-binding cassette sub-family A member 7*)

ABI3: miembro 3 de la familia del gen ABI (*ABI gene family member 3*)

ACE: enzima convertidor de angiotensina 1 (*angiotensin 1 converting enzyme*)

ACTH: hormona adrenocorticotropa (*adrenocorticotropic hormone*)

ADAM: α -secreta (*a disintegrin and metalloprotease domain*)

ADAMTS1: un motivo similar a la desintegrina y metaloproteasa con trombospondina tipo 1 número 1 (*a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif no. 1*)

ADAS-Cog: Escala de Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer-Subescala Cognitiva (*Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale*)

ADDL: oligómeros difusibles (*A β -derived diffusible ligands*)

AEP: endopeptidasa de asparagina (*asparagine endopeptidase*)

AgRP: proteína relacionada con el agutí (*agouti-related protein*)

AHN: núcleo hipotalámico anterior (*anterior hypothalamic nucleus*)

AICD: dominio C-terminal intracelular de APP (*APP intracellular C-terminal domain*)

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropiionic acid*)

AMPK: proteína quinasa activada por 5' AMP (*5' AMP-activated protein kinase*)

APH1: faringe anterior defectuosa 1 (*anterior pharynx-defective 1*)

APH1B: homólogo B de APH1 (*APH1 homolog B*)

APOE: apolipoproteína E (*apolipoprotein E*)

APP: precursor de la proteína amiloide (*amyloid precursor protein*)

ARC: núcleo arcuato (*arcuate nucleus* (ARC))

A β : β -amiloide (*amyloid- β*)

A η : η -amiloide (*amyloid- η*)

BACE1: β -secretasa (*beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*)

BCKDK: cetoácido deshidrogenasa quinasa de cadena ramificada (*branched chain ketoacid dehydrogenase kinase*)

BDS: Escala de Demencia de Blessed (*Blessed Dementia Scale*)

BIN1: integrador de puenteo 1 (*bridging integrator 1*)

BMD: densidad mineral ósea (*bone mineral density*)

BVR-A: biliverdina reductasa A (*biliverdin reductase A*)

C83: fragmento C-terminal α (CTF α)

C99: fragmento C-terminal β (CTF β)

CAA: angiopatía amiloide cerebral (*cerebral amyloid angiopathy*)

CART: transcrito regulado por cocaína y anfetamina (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*)

CASS4: miembro 4 de la familia de proteínas de andamiaje cas (*cas scaffolding protein family member 4*)

CAT: catalasa (*catalase*)

CBF: flujo sanguíneo cerebral (*cerebral blood flow*)

CD2AP: proteína asociada a CD2 (CD2-associated protein)

CD33: cluster de diferenciación 33 (*cluster of differentiation 33*)

CDK5: quinasa dependiente de ciclina 5 (*cyclin-dependent kinase 5*)

CLNK: enlazador de células hematopoyéticas dependiente de citoquinas (*cytokine dependent hematopoietic cell linker*)

CLU: clusterina (*clusterin*)

CR1: receptor de complemento 1 (*complement receptor 1*)

DCI: D-Chiro-inositol

DMN: núcleo dorsomedial (*dorsomedial nucleus*)

DPIN: D-Pinitol (3-O-metil-DCI)

DRX: difracción de rayos X

EA: enfermedad de Alzheimer

ECE: enzima convertidora de endotelina (*endothelin-converting enzyme*)

EED: desarrollo de ectodermo embrionario (*Embryonic Ectoderm Development*)

EIF4G: factor de iniciación de la traducción eucariota 4γ (*eukaryotic translation initiation factor 4γ*)

EM: microscopía electrónica (*electron microscopy*)

EPDR1: relacionado a ependimina 1 (*ependymin related 1*)

EPHA1: receptor de efrina tipo A1 (*ephrin type-A receptor 1*)

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase*)

FDG: fluorodesoxiglucosa

FERMT2: homólogo 2 de la familia de ferritina (*ferritin family homolog 2*)

FOS: protooncogén c-Fos (*c-Fos protooncogen*)

FPR: receptor de péptido de formilo (*formyl peptide receptor*)

FSH: hormona foliculoestimulante (*follicle-stimulating hormone*)

FTIR-ATR: resonancia infrarroja con transformada de Fourier – reflectancia total atenuada (*Fourier transform infrared resonance - total attenuated reflectance*)

GFAP: proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary activation protein*)

GH: hormona de crecimiento (*growth hormone*)

GHSR: receptor de la hormona secretagoga de la GH (*GH secretagogue receptor*)

GIP: polipéptido inhibidor gástrico (*gastric inhibitory polypeptide*)

GLP-1: péptido similar a glucagón 1 (*glucagón-like peptide 1*)

GLUT: transportadores de glucosa (*glucose transporter*)

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina (*gonadotropin-releasing hormone*)

GOT/AST: transaminasa glutámico-oxalacética (*glutamic oxaloacetic transaminase*)

GPT/ALT: transaminasa glutámico-pirúvica (*glutamate pyruvate transaminase*)

GPx: glutatión peroxidasa (*glutathione peroxidase*)

GRB2: proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (*growth factor receptor-bound protein 2*)

GSK-3 β : glucógeno sintasa-quinasa 3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*)

GSM: modulador de la γ -secretasa (*γ -secretase modulators*)

GST: glutatión-S-transferasa (*glutathione-S-transferase*)

GTT: prueba de tolerancia a la glucosa (*glucosa tolerance test*)

GWAS: estudios de asociación del genoma completo (*genome-wide association study*)

HDL: lipoproteína de alta densidad (*high density lipoprotein*)

HLA-DQA1: complejo de antígeno leucocitario humano DQA1 (*human leukocytary antigen complex 1 DQA1*)

IBA1: molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*)

IDE: enzima degradadora de insulina (*insulin-degrading enzyme*)

IECA: Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía

IGF-1 factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (*insulin-like growth factor 1*)

IL-1 β : interleuquina 1 β (*interleukin 1 β*)

IL34: interleuquina 34 (*interleukin 34*)

IMC: índice de masa corporal

INE: Instituto Nacional de Estadística

INPP5D: inositol polifosfato-5-fosfatasa (*inositol-polyphosphate 5-phosphatase*)

IPG: inositol fosfoglicano (*inositol phosphoglycan*)

IR: receptor de insulina (*insulin receptor*)

IRS1: sustrato del receptor de insulina 1 (*insulin receptor substrate 1*)

JUN: factor de transcripción AP-1 (*AP-1 transcription factor*)

K_{ATP}: canales de potasio modulados por ATP

LDL: lipoproteína de baja densidad (*low density lipoprotein*)

LDLR: receptor de lipoproteína de baja densidad (*low density lipoprotein receptor*)

LH: hormona luteinizante (*luteinizing hormone*)

LN: núcleo lateral (*latera nucleus*)

LRP1: proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein receptor-related protein 1*)

LTP: potenciación a largo plazo (*long-term potentiation*)

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*)

MAPT: proteína tau asociada a microtúbulo (*microtubule-associated protein tau*)

MCH: hormona concentradora de melanina (*melanin-concentrating hormone*)

MEC: Mini-Examen Cognoscitivo

MEK: MAPK/ERK quinasa (también conocida como MAPKK) (*MAPK/ERK kinase*)

Micro-CT: micro-tomografía computerizada (*Micro-computerized tomography*)

MINDY2/ADAM10: proteína 10 que contiene el dominio de desintegrina y metaloproteínasa (*disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*)

MMSE: Mini Examen del Estado Mental (*Mini-Mental State Examination*)

MN: núcleos mamilares (*mammillary nuclei* (MN))

MNK: quinasa que interactúa con la señal de MAP quinasa (también conocida como MKNK) (*MAP kinase signal-interacting kinase*)

MoCA: Evaluación Cognitiva de Montreal (*Montreal Cognitive Assessment*)

MRI: imagen de resonancia magnética (*magnetic resonance imaging*)

MS4A: atravesador de membrana 4A (*membrane-spanning 4A*)

mTOR: complejo 2 de la diana de la rapamicina de los mamíferos (*mammalian target of rapamycin complex 2*)

MWM: prueba del laberinto acuático de Morris (*Morris water maze*)

NFAT: factor nuclear de células T activadas (*nuclear factor of activated T cells*)

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NFT: ovillo neurofibrilar (*neurofibrillary tangle*)

NIA: Instituto Nacional de Edad (*National Institute on Aging*)

NIA-AA: Instituto Nacional de Edad y Asociación de Alzheimer (*National Institute on Aging and Alzheimer's Association*)

NMDA: de N-metil-d-aspartato (*N-methyl-d-aspartate*)

NOS: especies reactivas de nitrógeno (*nitrogen-reactive species*)

NPY: neuropéptido Y (*neuropeptide Y*)

NVC: acoplamiento neurovascular (*neurovascular coupling*)

p70S6K β : p70 quinasa S6 ribosomal β (también conocida como S6K β 2) (*p70 ribosomal S6 kinase β*)

p90S6K: proteína ribosomal S6 quinasa 1 de 90 kDa (también conocida como S6K α 1) (*90 kDa ribosomal protein S6 kinase 1*)

PAI-1: activador de plasminógeno 1 (plasminogen activator 1)

PCOS: síndrome de ovario poliquístico (*polycystic ovary syndrome*)

PDHP: piruvato deshidrogenasa fosfatasa (*pyruvate dehydrogenase phosphatase*)

PKA: proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositida (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*)

PKC: proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositida (*pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1*)

PET: tomografía por emisión de positrones (*positron-emission tomography*)

PGC1: coactivador 1 (*coactivator 1*)

Pgp: glucoproteína-P o glucoproteína de permeabilidad (*permeability glycoprotein*)

PHF: filamentos helicoidales emparejados (*paired helical filaments*)

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa (*phosphatidylinositol 3-kinase*)

PICALM: proteína ensambladora de clatrina que se une al fosfatidilinositol (*phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein*)

PIP2: fosfatidilinositol (4,5)-difosfato (*phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*)

PIP3: fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (*phosphatidylinositol (3,4,5)-bisphosphate*)

PKA: proteína quinasa A (*protein kinase A*)

PLC: fosfolipasa C (*phospholipase C*)

PLCG2: fosfoinosítido fosfolipasa γ 2 (1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase γ 2)

PLD: fosfolipasa D (*phospholipase D*)

PN: núcleo posterior (*posterior nucleus* (PN))

POMC: proopiomelanocortina (*proopiomelanocortin*)

PON: núcleo preóptico (*preoptic nucleus*)

PP2A: proteína fosfatasa 2A (*protein phosphatase 2A*)

PP2C: proteína fosfatasa 2C (*protein phosphatase 2C*)

PPAR: receptor activado por proliferador de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptors*)

PS1 (PSEN1): presenilina 1

PS2 (PSEN2): presenilina 2

PTEN: proteína homóloga de fosfatasa y tensina (*phosphatase and tensin homolog protein*)

PTK2B: proteína tirosina quinasa 2 β (*protein tyrosine kinase 2 β*)

PVN: núcleo paraventricular (*paraventricular nucleus*)

RANKL: ligando de receptor activador para el NF- κ B (ligand of receptor activator of NF- κ B)

rhGH: GH recombinante humana (*recombinant human GH*)

RICTOR: compañero insensible a la rapamicina de mTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*)

ROS: especies reactivas de oxígeno (*oxygen-reactive species*)

sAPP α : fragmento α soluble de APP (*soluble APP α*)

sAPP β : fragmento β soluble de APP (*soluble APP β*)

SCIMP: adaptador de CSK y proteína de membrana que interactúa con CSK (*SLP Adaptor And CSK Interacting Membrane Protein*)

SCN: núcleo supraquiasmático (*suprachiasmatic nucleus*)

SHC: proteína transformadora de SHC (*SHC-transforming protein*)

SKAR: S6K1 objetivo similar a Aly/REF (también conocido como POLDIP3) (*S6K1 Aly/REF-like target*)

SLC24A4: miembro 24 de la familia de intercambiadores de solutos (*solute carrier family 24 member 4*)

SOD: superóxido dismutasa (*superoxide dismutase*)

SON: núcleo supraóptico (*supraoptic nucleus*)

SORL1: receptor relacionado con sortilina L1 (*sortilin-related receptor L1*)

SOS: son of sevenless (*son of sevenless*)

SPI1: factor de transcripción PU.1 (*transcription factor PU.1*)

SPPL2A: péptido señal similar a la peptidasa 2A (*signal peptide peptidase-like 2A*)

SR: receptor *scavenger* (*scavenger receptor*)

SREBP: proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (*sterol regulatory element-binding protein*)

STAT5: transductor de señales y activador transcripcional 5 (*signal transducer and activator of transcription*)

STZ: estreptozotocina (*streptozotocyn*)

T1DM: diabetes de tipo 1 (*type 1 diabetes mellitus*)

T2DM: diabetes de tipo 2 (*type 2 diabetes mellitus*)

TAG: triglicérido (*triacylglycerol*)

Tg^{5xFAD/-}: modelo heterocigoto de 5xFAD

Tg^{5xFAD/5xFAD}: modelo homocigoto de 5xFAD

TLR: receptores de tipo *toll* (*toll-like receptor*)

TMN: núcleo tuberomamilar (*tuberomammillary nucleus*)

TNF- α : factor de necrosis tumoral α (*tumor necrosis factor α*)

TREM2: receptor desencadenante expresado en células mieloides 2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*)

TRH: hormona liberadora de tirotropina (*thyrotropin-releasing hormone*)

TSC1: complejo de esclerosis tuberosa 1 o hamartina (*tuberous sclerosis complex 1 or hamartin*)

TSC2: complejo de esclerosis tuberosa 2 o tuberina (*tuberous sclerosis complex 2 or tuberin*)

TSH: hormona estimulante de la tiroides (también llamada tirotropina) (*thyroid-stimulating hormone*)

TSPOAP1: proteína 1 asociada a TSPO (*TSPO associated protein 1*)

UNC5CL: proteína similar al homólogo C de Unc 5 (Unc-5 homolog C-like protein)

USP6NL: proteína similar a N-terminal USP6 (*USP6 N-terminal-like protein*)

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad (*very low density lipoprotein*)

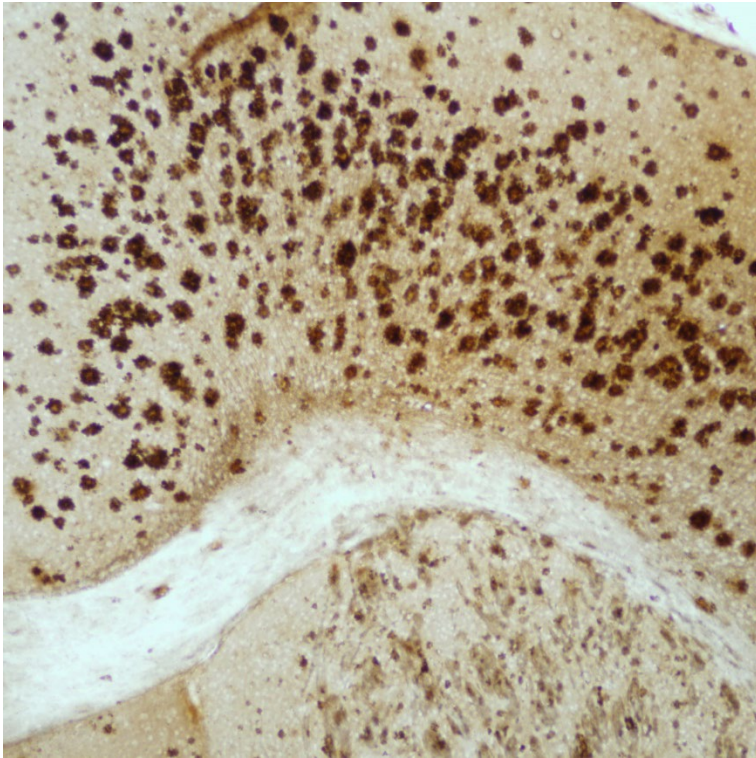
VLDLR: receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (*very low density lipoprotein receptor*)

VMN: núcleo ventromedial (*ventromedial nucleus*)

WNT3: Wnt 3 (*Wnt 3*)

YM: prueba de laberinto en Y (*Y-maze*)

ÍNDICE



| | |
|---|----|
| 1. SUMMARY | 1 |
| 1.1 Abstract | 2 |
| 1.2 Literature review | 5 |
| 1.3 Hypothesis and aims of the study | 12 |
| 1.4 Material and methods..... | 14 |
| 1.4.1 Animals and treatment | 14 |
| 1.4.2 Physiological, metabolic, and behavioral analysis | 14 |
| 1.4.3 Molecular and histological analysis..... | 15 |
| 1.5 Results and discussion..... | 16 |
| 1.5.1 Preliminary results | 16 |
| 1.5.2 Study 1: The biomedical uses of inositols: a nutraceutical approach to metabolic dysfunction in aging and neurodegenerative diseases..... | 16 |
| 1.5.3 Study 2: A Negative Energy Balance Is Associated with Metabolic Dysfunctions in the Hypothalamus of a Humanized Preclinical Model of Alzheimer's Disease, the 5xFAD Mouse | 18 |
| 1.5.4 Dietary administration of D-chiro-inositol attenuates sex-specific metabolic imbalances in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease | 20 |
| 1.5.5 Complementary results: efficacy of DCI administration in amyloid pathology in the liver and osteoporotic phenotype in 5xFAD female mice..... | 22 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 24 |
| 2.1 Introducción de los trabajos presentados..... | 25 |
| 2.1.1 Usos biomédicos de los inositoles..... | 25 |
| 2.1.2 Caracterización metabólica del ratón 5xFAD modelo de Alzheimer..... | 25 |
| 2.1.3 Eficacia del D-Chiro-inositol en el declive metabólico y cognitivo del ratón 5xFAD modelo de Alzheimer | 26 |
| 2.2 Principales características y epidemiología de la enfermedad de Alzheimer a nivel mundial | 27 |
| 2.3 Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer en Andalucía y España | 27 |
| 2.4 Diagnóstico actual de la enfermedad de Alzheimer y nuevas perspectivas | 28 |
| 2.5 Enfermedad de Alzheimer familiar y esporádica | 30 |
| 2.5.1 Enfermedad de Alzheimer familiar | 30 |
| 2.5.2 Enfermedad de Alzheimer esporádica | 30 |
| 2.6 Papel de A β en la patología de la enfermedad de Alzheimer | 33 |
| 2.6.1 Metabolismo del péptido A β | 33 |
| 2.6.2 Procesamiento por ruta no amiloidogénica: α -secretasa y γ -secretasa | 34 |
| 2.6.3 Procesamiento por ruta amiloidogénica: β -secretasa y γ -secretasa | 34 |
| 2.6.4 Procesamiento alternativo: η -secretasa, α -secretasa, β -secretasa y γ -secretasa .. | 35 |
| 2.6.5 Polimerización y neurotoxicidad del péptido A β | 37 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.6.6 | Eliminación de A β | 38 |
| 2.7 | Papel de tau en la patología de la enfermedad de Alzheimer | 38 |
| 2.8 | Hipótesis de la cascada amiloide como causa de la enfermedad de Alzheimer..... | 40 |
| 2.9 | El estrés oxidativo y la neuroinflamación como potenciales mecanismos desencadenantes de la enfermedad de Alzheimer..... | 41 |
| 2.10 | La señalización de insulina en el cerebro..... | 42 |
| 2.11 | Mecanismo de señalización de la insulina | 42 |
| 2.11.1 | Vía canónica de la señalización de insulina..... | 43 |
| 2.11.2 | Vía no canónica de la señalización de insulina..... | 44 |
| 2.12 | Evidencias de resistencia a la insulina en la enfermedad de Alzheimer | 44 |
| 2.13 | Estado actual de la terapia farmacológica en la enfermedad de Alzheimer | 46 |
| 2.14 | El balance energético como factor en la enfermedad de Alzheimer | 47 |
| 2.14.1 | Asociación entre la obesidad, resistencia a insulina, diabetes y enfermedad de Alzheimer | 48 |
| 2.14.2 | Asociación entre la pérdida de peso no intencionada, la disfunción endocrina y enfermedad de Alzheimer..... | 49 |
| 2.14.3 | El control hipotalámico del balance energético en la EA..... | 50 |
| 2.14.4 | Pérdida de señalización de insulina en la EA..... | 53 |
| 2.14.5 | Asociación de la osteoporosis con la enfermedad de Alzheimer..... | 54 |
| 2.14.6 | Asociación entre la menopausia y la enfermedad de Alzheimer | 55 |
| 2.14.7 | El hígado como reservorio de energía y eliminación de A β | 56 |
| 2.15 | El metabolismo y la insulina y como dianas terapéuticas: el D-Chiro-inositol como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer | 57 |
| 2.15.1 | La insulina como diana terapéutica en la demencia y enfermedad de Alzheimer . | 58 |
| 2.15.2 | D-Chiro-inositol: obtención, mecanismo de acción y su uso como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer | 59 |
| 2.15.3 | D-Chiro-inositol y la señalización de insulina | 59 |
| 2.15.4 | D-Chiro-inositol y su uso como tratamiento en la enfermedad de Alzheimer | 60 |
| 2.16 | Modelos animales de la enfermedad de Alzheimer: el ratón 5xFAD..... | 60 |
| 3. | HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 64 |
| 4. | METODOLOGÍA | 68 |
| 4.1 | Animales y tratamiento..... | 69 |
| 4.2 | Análisis fisiológico, metabólico y de comportamiento | 69 |
| 4.3 | Análisis molecular e histológico | 70 |
| 4.4 | Tinción con rojo Congo de secciones del hígado | 71 |
| 4.5 | Evaluación de los parámetros auxológicos y análisis morfométrico y de porosidad del hueso trabecular y cortical de los fémures..... | 71 |

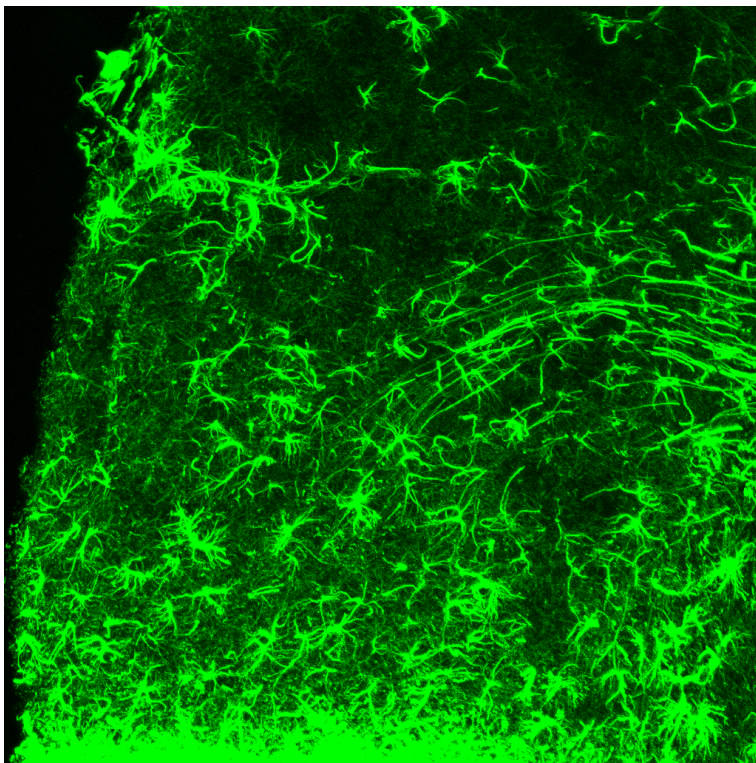
| | |
|---|-----|
| 5. RESUMEN DE RESULTADOS | 73 |
| 5.1 Estudio de farmacodinámica del DCI en un modelo de rata Wistar (resultados preliminares no publicados)..... | 74 |
| 5.2 Caracterización del mecanismo de señalización del DCI y uso como tratamiento en la enfermedad de Alzheimer (primer artículo publicado, año 2020) | 76 |
| 5.3 Caracterización del fenotipo de desregulación metabólica en el modelo 5xFAD de la enfermedad de Alzheimer (segundo artículo publicado, año 2021) | 77 |
| 5.4 Estudio de la eficacia de la suplementación de DCI sobre las alteraciones metabólicas y cognitivas identificadas en el modelo 5xFAD de enfermedad de Alzheimer (tercer artículo publicado, año 2022)..... | 80 |
| 5.5 Detección de amiloidosis hepática de ratonas hembras 5xFAD y eficacia del DCI en la eliminación de placas amiloides en el hígado (resultados no publicados) | 82 |
| 5.6 Alteraciones en la estructura ósea trabecular y cortical en ratones 5xFAD asociadas a un desbalance en los niveles de insulina y eficacia del DCI (resultados no publicados)..... | 84 |
| 6. DISCUSIÓN | 87 |
| 6.1 El DCI como tratamiento de la EA | 90 |
| 6.1.1 El DCI promueve la señalización de insulina y ejerce un efecto antioxidante y antiinflamatorio | 90 |
| 6.1.2 El DCI evita el daño neuronal causado por A β y reduce la hiperfosforilación de tau | 92 |
| 6.2 La patología amiloide en la pérdida de peso en la EA..... | 93 |
| 6.2.1 Pérdida de peso y alteraciones en la ingesta y gasto energético en el modelo 5xFAD | 94 |
| 6.2.2 La disfunción hipotalámica y la inflamación en el modelo 5xFAD | 95 |
| 6.2.3 La eficacia del DCI en la reducción de la respuesta inflamatoria en el hipotálamo y el balance energético | 97 |
| 6.3 El DCI frena el progreso del deterioro cognitivo en los ratones 5xFAD | 98 |
| 6.4 Los ratones 5xFAD presentan alteraciones hormonales y lipídicas en plasma ligados al sexo | 99 |
| 6.4.1 Los ratones 5xFAD presentan niveles reducidos en plasma de secretagogos de insulina, insulina y otras hormonas y pérdida de señalización endocrina en el hipotálamo | 100 |
| 6.4.2 Los ratones 5xFAD muestran niveles alterados de hormonas hipofisarias en plasma específicas de sexo | 102 |
| 6.4.3 El perfil lipídico plasmático se encuentra alterado en los ratones 5xFAD | 103 |
| 6.4.4 La eficacia del DCI en la normalización de los niveles de hormonas y lípidos en plasma en los ratones 5xFAD | 103 |
| 6.5 Alteraciones metabólicas en el hígado de los ratones 5xFAD | 105 |
| 6.5.1 Las hembras 5xFAD muestran patología amiloide exacerbada asociada a la acumulación de ácidos grasos en el hígado | 105 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 6.5.2 | La eficacia del DCI en la disminución de los niveles de ácidos grasos y la patología amiloide en el hígado de las hembras 5xFAD | 106 |
| 6.6 | Alteraciones microestructurales en el fémur de los ratones 5xFAD..... | 107 |
| 6.6.1 | Los ratones 5xFAD muestran alteraciones de la estructura ósea revertidas parcialmente por el tratamiento con DCI | 107 |
| 6.6.2 | La eficacia del DCI en la prevención del fenotipo osteoporótico en los ratones 5xFAD | 109 |
| 6.7 | Limitaciones del estudio..... | 110 |
| 6.8 | Perspectivas de futuro | 112 |
| 7. | CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS | 114 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA | 119 |
| 9. | ANEXOS | 146 |

Tablas y Figuras

| | | |
|------------|---|----|
| Tabla 1. | Genes cuya mutación provocan Alzheimer familiar..... | 30 |
| Tabla 2. | Genes cuya mutación aumentan el riesgo de Alzheimer esporádico..... | 31 |
| Figura 1. | Procesamiento amiloidogénico y oligomerización del péptido β -amiloide..... | 36 |
| Figura 2. | Patrón de desarrollo de la patología amiloide y la patología de tau..... | 40 |
| Figura 3. | Ruta de señalización de insulina..... | 44 |
| Figura 4. | Ensayos clínicos actuales en la enfermedad de Alzheimer..... | 47 |
| Figura 5. | Estructura y funciones de los núcleos hipotalámicos..... | 52 |
| Figura 6. | Riesgo de demencia en función de los niveles de insulina plasmática..... | 54 |
| Figura 7. | Relación entre la patología hepática y la enfermedad de Alzheimer..... | 57 |
| Figura 8. | Descripción del genotipo y fenotipo del modelo 5xFAD..... | 63 |
| Figura 9. | Esquema de trabajo con los ratones 5xFAD tratados con D-Chiro-inositol..... | 70 |
| Figura 10. | Análisis bioquímico en ratas Wistar tratadas con D-Chiro-inositol..... | 75 |
| Figura 11. | Resumen de las alteraciones metabólicas del ratón 5xFAD..... | 79 |
| Figura 12. | Eficacia del D-Chiro-inositol en la regulación hipotalámica del apetito..... | 81 |
| Figura 13. | Eficacia del D-Chiro-inositol en la amiloidosis hepática de hembras 5xFAD..... | 83 |
| Figura 14. | Reconstrucción 3D del fémur de ratones 5xFAD..... | 84 |
| Figura 15. | Eficacia del D-Chiro-inositol en la osteoporosis de hembras 5xFAD..... | 86 |

1. SUMMARY



1.1 Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent form of dementia, being one of the most determinant health problems in the world given its incidence and the continuous growth of cases associated with population aging. One of the certainties of AD is that it manifests at the biological level through the accumulation of extracellular plaque deposits of amyloid- β ($A\beta$) peptide due to its overproduction and a deficient clearance mechanism, in addition to the formation of neurofibrillary tangles (NFTs) of hyperphosphorylated tau in a pathological process that results in an inflammatory response accompanied by a loss of synapses and neuronal death, sequentially in appearing in brain regions controlling memory, reasoning, and language (1). This results in death after 3 to 9 years of initial diagnosis based on cognitive decline. Although the amyloid cascade theory, which implies the formation of $A\beta$ plaques as the trigger of AD cellular pathology, is widely accepted as the probable cause or cause-effect of AD development, there is still a large information gap on all possible events contributing to the development of the pathology up to 20 years before the onset of cognitive decline. The timing of pharmacological intervention and the difficulty to identify reliable biomarkers of AD are two of the main obstacles to reaching a successful therapy.

There has been a recent shift in the trend towards understanding how other factors not intrinsic to amyloid pathology might pose a risk and contribute to the development of AD. There is increasing evidence linking disorders of food intake, and peripheral metabolism with processes that induce neuroinflammation and neurodegeneration such as AD which is associated with the accumulation of $A\beta$ plaques, hyperphosphorylation of tau, and the appearance of neurofibrillary tangles, as well as central insulin resistance. Recent epidemiological studies reveal that low body mass index (BMI) and unintentional weight loss during midlife contribute to an increased risk of AD (2-9). In addition, neuroendocrine disturbances such as low blood insulin levels and hormonal imbalances during aging and menopause are interrelated and positively correlated with the development of AD in humans, favoring the deposition of $A\beta$ and hyperphosphorylated and tau (10, 11). However, the biological mechanisms by which they are reproduced and how they might affect the development of AD in the context of genetic vulnerability are still unknown.

There are currently several preclinical studies and clinical trials based on the use of drugs targeting insulin for the treatment of AD, such as metformin or intranasal insulin itself, showing mixed results so far. The use of these pharmacological treatments also poses certain challenges associated with safety, bioavailability, and undesirable secondary effects in the body. The need arises for a pharmacological approach that can be administered safely, whose route of administration is manageable for the patient, and has a well-described mechanism of action. Given this situation, one of the proposed alternatives is the use of nutraceuticals such as D-chiro-inositol (DCI), a compound normally incorporated in the diet and an intermediate of the non-canonical insulin signaling pathway, which promotes insulin secretion, exerts antioxidant and anti-inflammatory activity, and whose use is safe (12). A detailed description of the origin of DCI, its sources, mechanism of action, and prospects as a treatment for neurodegenerative diseases in AD has been made in the first article included in this Ph.D. project.

For the past two decades, murine models carrying mutations normally associated with familial AD in the *APP* and *PSEN1* genes have been developed with the aim of reproducing the pathology of Alzheimer's disease as closely as possible, in order to study the efficacy of targeted therapies to reverse the progression of AD. The murine model has several advantages: adaptability to small space environments, ease of handling and maintenance, physiological similarity to humans

and a short life cycle. These animal models try to reproduce the pathological alterations of AD; however, they are not able to reproduce with full fidelity the amyloid pathology both at the biological level and in the cognitive characteristics developed. Most models based on combined *APP* and *PSEN1* mutations promote the formation of A β 1-42 fragments and the accumulation of diffuse and senile plaques (13-15). The 5xFAD mice co-express and co-inherit familial Alzheimer's disease (FAD) mutant forms of human transgenes for *APP* (the Swedish mutation: K670N, M671L; the Florida mutation: 1716 V; the London mutation: V717I) and *PS1* (M146L; L286V) under transcriptional control of the neuron-specific mouse *Thy-1* promoter (14). These mice show the greatest similarity in cellular and molecular events in human amyloid pathology; hence we chose the 5xFAD mouse model of AD to study the metabolic disturbances occurring during the initial stages of AD that could contribute to amyloid-derived cognitive decline (14). The study of these metabolic changes could provide information for the detection of possible early metabolic biomarkers indicative of the development of Alzheimer's pathology. Knowing the mechanisms through which these metabolic changes occur is necessary to establish the pathway of action and the efficacy of therapeutic strategies such as the use of DCI as a treatment for loss of insulin signaling and metabolic imbalance.

In the present Ph.D. thesis, we have evaluated the efficacy of treatment with DCI, a natural compound that intervenes and activates insulin signaling, possesses anti-inflammatory and antioxidant properties, as a potential treatment for AD in early stages. Essentially, in prodromal stages of AD, metabolic and hormonal changes are observed that increase the risk of AD, including lower body weight accompanied by progressive weight loss, low insulin levels and brain insulin resistance, liver dysfunction or osteoporosis. These processes have been described in a transgenic model of AD such as the 5xFAD mouse, allowing us to analyze the efficacy of DCI administration in slowing and halting progressive metabolic and cognitive deterioration in these animals. The most relevant contributions of this work are:

- 1) The description of the physiological activity of inositols, proposing a model of insulin signaling pathway where the DCI participates, and describing its antioxidant capacity according to the results seen so far. Subsequently, the capacity of DCI as a possible treatment for AD has been further explored, intervening in the formation and toxicity of A β -peptide in addition to other possible treatment targets related to metabolic dysfunction in the periphery
- 2) The characterization of those mechanisms that lead to physiological and metabolic alterations observed in AD in prodromal states, both centrally and in the periphery in the 5xFAD mouse model of AD. We defined structural and endocrine signaling alterations in the hypothalamus, as well as in the periphery, leading to a negative energy balance and weight loss in 5xFAD mice similar to what has been observed in AD patients. It was determined that the inflammatory process in the hypothalamus and the loss of hormonal signaling were related to weight loss in 5xFAD animals, which was more pronounced in females and was due to a lower intake of the animals, compensated by a decrease in energy expenditure, a pattern observed during aging. There was also evidence of liver damage and deregulation of plasma triacylglycerol levels specifically in 5xFAD females, which could be associated with a deregulation of lipid metabolism.
- 3) We evaluated the ability of DCI to reverse the negative energy balance in 5xFAD mice, focusing on the effects of DCI on parameters of intake, energy expenditure, hypothalamic inflammation, plasma hormone levels, and liver pathology. In this study, male and female 5xFAD homozygotes were used and it was observed that treatment

with DCI from 6 months of age, where the pathophysiological mechanisms of metabolism in this model were first described, until 10 months of age. DCI was able to reverse progressive weight loss by increasing food intake, as well as slowing the deterioration of short-term memory and cognitive flexibility. In addition, DCI treatment normalized abnormally low levels of insulin, gastric inhibitory polypeptide (GIP), and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in 5xFAD animals, which in turn was associated with the hypothalamic inflammatory process and weight loss. The 5xFAD females showed a fatty liver phenotype and hepatic amyloid accumulation, and an osteoporotic phenotype, which was reversed by DCI administration.

Overall, these results depict that the 5xFAD mouse model of AD reproduces metabolic imbalances seen as risk factors for AD development in humans, linking the metabolic disturbances seen in prodromal states to latent amyloid pathology. This study opens a range of possibilities regarding the potential efficacy of insulin-sensitizing agents, such as DCI, in the development of metabolic disorders that may lead to aggravation of AD.

1.2 Literature review

As the life expectancy of the population increases, age-related degenerative disorders are increasing their health and socioeconomic impact on public health. It is estimated that 10% of adults over 65 years of age are currently living with AD and that, over the next 30 years, its incidence worldwide will reach 152 million. The main distinguishing cellular and molecular features of AD are twofold: 1) the abnormal deposition of extracellular plaques of β -amyloid ($A\beta$) peptide, which is formed from the breakdown of a larger protein, called amyloid precursor protein (APP), which is subject to the protease activity of β -secretase (the β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) isoform being predominant) and γ -secretase; 2) the formation of neurofibrillary tangles of tau protein, which under normal conditions binds and stabilizes to microtubules, but in the AD process, tau loses its ability to bind to microtubules and attaches to other tau molecules, forming intracellular "fibrils" that cause neuronal damage and loss of synaptic communication between neurons (1). There are three stages in the progression of AD: 1) a preclinical pathogenic stage, in which changes start to happen at the cellular and molecular level years before symptoms appear; 2) a prodromal stage of mild cognitive impairment, in which the initial symptoms and signs of AD appear but do not significantly affect daily activities, such as word-finding issues, slight visuospatial disorientation, and some decline in reasoning; and 3) a clinical phase where further memory impairment is experienced, progressing to a moderate state where damage to brain areas controlling language, reasoning, smell, and sensory processing, leads to severe problems in recognizing relatives, performing simple tasks or facing new situations, until the patient enters a state of total dependence (16). Death occurs between 3 and 9 years after diagnosis, being the fifth leading cause of death in the world.

The difficulty in diagnosing AD is one of its major drawbacks. Currently, three criteria are used to diagnose non-familial AD (lack of genetic mutations causing familial AD): 1) a demonstration of memory and/or learning impairment; 2) tracking of progressive decline over time without possible plateaus or stages of stabilization; and 3) the absence of other neurodegenerative pathologies, cerebrovascular diseases, or other conditions that may cause cognitive problems with a mixed etiology (17). The severity of cognitive impairment is typically assessed based on anamnesis and the results of cognitive tests that assess, among other things, short-term memory, temporal-spatial orientation, language, concentration, problem-solving skills, and dependency levels. Several approaches using biomarkers, such as the presence of $A\beta$ and phosphorylated tau in the cerebrospinal fluid, have been implemented in the definition of AD patients in research, whereas clinical diagnosis is still based on cognitive symptoms (18).

Cases of AD are usually classified according to the age of onset of characteristic symptoms and the patient's family history. When the patient presents with symptoms between the ages of 30-50 years, it is known as early-onset or familial AD, whereas, if the development occurs after the age of 60 years, it comprises late-onset or sporadic AD. Familial AD comprises between 1-6% of cases of AD and is the consequence of a dominant monogenic mutation. Mutations leading to familial Alzheimer's disease are those affecting the amyloid precursor protein (APP) gene, the presenilin 1 (PS1) and presenilin 2 (PS2) genes, thus leading to exacerbated production of $A\beta$. On the other hand, sporadic AD comprises most cases, whose origin of symptoms occurs between approximately 60-65 years of age, and its prevalence increases with advancing age. The origin of sporadic AD is insidious, although over the years it has been described that environmental causes, dietary habits, comorbidity with other diseases, and the presence of certain polymorphisms in specific genes, influence the probability of developing this pathology.

So far, the mechanism of A β plaque formation and tau tangle formation has been extensively studied, although there are still disparate opinions as to whether these events are causal or a consequence of the true onset of sporadic AD. The generation of the A β peptide occurs from the sequential processing of the APP protein, which generates A β fragments of 37 to 43 amino acids, the main toxic species being the A β_{1-40} and A β_{1-42} fragments, produced by the amyloidogenic processing of APP (19). The amyloidogenic pathway of APP processing is initiated by the activity of the enzyme β -secretase, which is active in the lumen of vesicles and exhibits an endocytic pathway, and then followed by γ -secretase (consisting of PS1, PS2, nicastrin, and APH-1 subunit), resulting in the formation of the A β peptide, which is released into the extracellular space. Depending on the amino acid where the cleavage occurs, different types of A β fragments are formed, predominantly A β_{1-40} fragments, and A β_{1-42} , the latter being more hydrophobic and with a tendency to form potentially neurotoxic aggregations.

A β peptides can be released into the extracellular milieu by the action of secretases or formed within endolysosomes. In its soluble monomeric form, the A β peptide is innocuous. The main difference between the A β_{1-40} and A β_{1-42} peptide isoforms is the presence of two hydrophobic amino acids in the latter, which confer an ability to aggregate into soluble oligomers and subsequently into insoluble plaques, which have a neurotoxic effect. So far it is known that oligomeric A β mediate the production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (NOS), alter the stability of the plasma membrane of neurons and microglia, and cause the interruption of neuronal synapses, autophagic processes, and mitochondrial dysfunction resulting in cell death (1, 20). These events trigger inflammatory processes and promote the hyperphosphorylation of tau. Insoluble A β fibrils aggregate in the parenchyma and begin to form extracellular deposits, such as senile or amyloid plaques, which are easily recognizable by immunohistochemical methods. One of the mechanisms described for the formation of dense plaques is the internalization of the A β peptide by endo- and phagocytosis processes, where fibrils have generated that end up forming amyloid plaques that promote cell death and their release to the extracellular medium. These neuritic plaques arise years before the onset of cognitive decline. Due to the presence of A β , dense bodies of lysosomal origin and high mitochondrial content can be found in the dystrophic neurites surrounding dense plaques (21-23).

The brain has several mechanisms to eliminate A β deposition. Microglia can recognize the A β peptide in amyloid plaques through their binding to membrane receptors, leading to a phagocytic process that ends up in the intracellular degradation of A β through the activity of various protease enzymes such as neprilysin, cathepsins, metalloproteases, plasminogen activators, angiotensin 1 converting enzyme (ACE), endothelin-converting enzyme (ECE) or insulin-degrading enzyme (IDE) (24-28). The binding of A β to toll-like receptors on microglia and astrocytes triggers an inflammatory response with the secretion of cytokines, leading to impaired A β degradation (29). Clearance of A β also occurs through the blood-brain barrier, the vascular system, and the lymphatic system. This occurs mostly as a result of apolipoprotein E (APOE) binding to the A β complex. In response to astrocyte stimuli, APOE is primarily produced by astrocytes and, to a lesser extent, by microglia and neurons (30). Although APOE promotes intracellular A β cleavage, the complex of APOE and A β can bind to the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) as well as the very low-density lipoprotein receptor (LDLR) in the astrocytes surrounding the brain's vascular endothelium, facilitating their transfer across the blood-brain barrier (31, 32). Furthermore, A β peptide in its soluble monomeric form can be cleared by direct binding to LRP1 (33).

Generally, the most widely accepted hypothesis as a plausible cause of AD is that arising from the amyloid cascade, which has been supported for more than two decades (34). In this assumption, the production of A β peptide is the central axis leading to cognitive impairment, which accumulates with age due to an increase in its production and a reduction in clearance mechanisms. The formation of soluble oligomers of A β has a neurotoxic effect, that may cause neuronal dysfunction. As a result, several protein kinases such as glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) and cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) are activated, leading to hyperphosphorylation of tau. One of the main underpinnings of the amyloid cascade hypothesis is the presence of mutations affecting the amyloidogenic processing of APP, which are sufficient to cause sporadic AD.

The fact that the amyloid cascade hypothesis, the most widely accepted by the scientific community, has certain gaps in explaining the causality of AD, has led to the parallel formulation of other hypotheses on the possible origin of AD. One hypothesis proposes that oxidative stress and neuroinflammation, which are events that are produced by the accumulation of A β and tau neurofibrillary tangles (NFTs), may not only be mere secondary players in response to the pathology, but one of the main causes. Early astrocyte reactivity may be one of the causes leading to synaptic dysfunction, as well as the inability to eliminate A β by APOE (35, 36). In addition, the production of cytokines such as interleukin 1 β (IL-1 β) or tumor necrosis factor 1 α (TNF- α) are factors that promote A β production, deriving in a positive feedback mechanism where there is an overactivation of the response of microglia and astrocytes in the brain (29). Another possible cause is exposure to pro-inflammatory stimuli such as peripheral system cytokines, which trigger microglia hyperreactivity so that a continuous inflammatory state in the organism could contribute to a neuroinflammatory response and defective clearance of A β peptide. This systemic inflammatory state may be due to causes such as peripheral insulin resistance, which generates an inflammatory response that alters autophagy dynamics in the brain and promotes the production of ROS that alter synaptic integrity (37-40).

Insulin regulates energy balance by stimulating gluconeogenesis and the production of triacylglycerols (TAGs). Insulin is a 51 amino acid hormone released by pancreatic β -cells. Both neurons and glial cells express the insulin receptor (IR), which is important for maintaining brain activity as it facilitates glucose use as an energy source and exerts neurotrophic activity by promoting synaptic plasticity and cell growth (41-45). On the other hand, the hypothalamus, a region of the brain that finely regulates the processes of food intake and energy expenditure, senses peripheral insulin plasma levels.

It has long been shown that AD progression is associated with dysregulation of insulin signaling in those regions associated with cognitive pathology, such as the limbic system and the hippocampus. A decrease in insulin gene expression has been observed in a pattern similar to the increased expression of APP and the astrocytic activation marker glial acidic protein (GFAP) and microglial ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) (46). In another post-mortem analysis of human hippocampus, a correlation has been found between elevated levels of phosphorylation at serine residues of insulin receptor substrate 1 (IRS1) with levels of oligomeric A β , which in turn were negatively associated with performance on working memory and episodic memory tasks (47). One of the mechanisms associated with dysfunction of insulin signaling in the brain is the susceptibility of the APOE- ϵ 4 allele, which has been shown in animal models to interact with IR and promote its sequestration in endosomes, preventing IR trafficking to the cell membrane and decreasing insulin signaling (48). These studies are consistent with brain glucose hypometabolism observed in APOE- ϵ 4 carriers (49). Another possible factor

contributing to decreased insulin signaling is sustained neuroinflammation in the brain of AD patients. Furthermore, it has been observed in a study performed in Beagle dogs that insulin signaling, through the protein biliverdin reductase A (BVR-A) the internalization of β -secretase in endosomes, decreasing the amyloidogenic pathway of APP processing and A β generation (50).

Insulin signaling has also been repeatedly associated with the regulation of tau activity. Brain insulin resistance results in increased activity of GSK-3 β , a secondary messenger on the insulin pathway which promotes tau hyperphosphorylation (51). Tau, in turn, interacts with the phosphatase and tensin homolog protein (PTEN), promoting inhibitory phosphorylation at serine residues of IRS1 and decreasing insulin signaling in a positive feedback mechanism (52).

As of 2022, as many as 442 clinical trials in AD and related dementias are currently supported, according to the National Institute on Aging (NIA) (53). Half of these are nonpharmacological treatments based on the care and well-being of patients with AD dementia, including the development of new technologies for patient care and monitoring of patient well-being. However, currently there are only 65 pharmacological clinical trials, of which only 8 reached clinical phase 3. Of these pharmacological interventions, most of them are targeting the A β peptide or aim to modulate the inflammatory response. Most of these pharmaceutical therapies target the A β peptide or include substances that lessen inflammatory response, making them the most prevalent. Most pharmaceutical strategies used to treat Alzheimer's disease in recent years have been based on the amyloid cascade hypothesis. However, these approaches fail to reach significant clinical results given the timing of administration, since molecular and cellular hallmarks of AD occur decades before cognitive symptoms manifest. Therefore, it is becoming ever more important to adopt a new approach focused on preventing or slowing down the disease's potential development. Evidence in recent years suggests that peripheral metabolism disorders, including alterations in body weight, endocrine system, and energy homeostasis processes may be early signs of risk for late-life AD development and severity. It is plausible that metabolic manifestations are interrelated to latent amyloid pathology, making it crucial to ascertain the metabolic imbalances related to the AD process. This would present new opportunities. This would open up new avenues of treatment, based on pharmacological alternatives that can be safely delivered in the prodromal stage of the disease.

Involuntary weight loss is one of the signs that can be observed during aging. Epidemiological studies have shown for years that weight loss and low BMI during middle age are associated with a higher rate of frailty and the development of neurodegenerative diseases such as AD in the elderly (2-9). Unwanted weight loss over the years in cognitively normal individuals is a marker of increased risk of developing AD and about 40% of people with dementia experience weight loss (54-56). Prospective studies have linked low BMI during middle age with increased plasma A β misfolding, indicative of the formation of soluble toxic oligomeric species (57). The causes by which weight loss occurs in AD are still unknown. In general, weight loss occurs through a negative energy balance, in which caloric intake does not compensate for energy expenditure, involving both external and internal factors. Follow-up studies suggest alterations in food intake, basal metabolism and sleep patterns are related to weight loss in AD patients (58, 59).

The control of energy balance is finely regulated by the hypothalamus, a heterogeneous brain region with adaptive ability to control the physiological mechanisms of energy intake and expenditure through the endocrine and autonomic nervous systems. Postmortem analyses have

shown atrophy of the hypothalamus in patients with AD (60-62). Studies in animal models of AD suggest that early weight loss in AD is related to a dysfunction of those hypothalamic nuclei responsible for the control of energy balance such as the arcuate nucleus (ARC), depicting hypothalamic inflammation and loss of neuropeptide Y (NPY, orexigenic) and proopiomelanocortin (POMC, anorexigenic) (63).

Given that reduced insulin and leptin plasma levels have been established as risk factors for AD, negative energy balance could be a result of hypothalamic dysfunction derived from a continuous neuroinflammation and decreased endocrine signaling in a feed-forward mechanism. Epidemiological studies have linked low insulin levels to the risk of AD. Studies in both male and female populations have found that excessively low basal plasma insulin levels are greater predictors of risk for the development of dementia and AD compared with high insulin levels, independently of the preclinical development of type 2 diabetes mellitus (T2DM) (10, 11). Aging reduces the activity of β -pancreatic cells. Therefore, low insulin levels could be indicative of premature aging, which could be found to be related to AD in its early stages. Although evidence in humans is scarce, murine models of AD depict loss of β -pancreatic cell mass, interfering with insulin release and glucose homeostasis (10, 64, 65). Another insulin-related hormone is leptin, whose plasma levels are dependent on the volume of visceral white adipose tissue. Epidemiological studies have observed that plasma leptin levels are generally lower in patients with dementia and AD (66). However, this association has been found in older patients, so that reduced leptin levels could be a secondary consequence of weight loss occurring at earlier stages. Insulin secretion is also regulated by the hypothalamus, and insulin signaling in the hypothalamus is essential to initiate mechanisms for glycemic control and body weight maintenance. Insulin is a trophic factor essential for glial functioning, hence disruption of insulin signaling in the brain leads to defective glial-neuron coupling and progressive neurodegeneration.

In recent years, research has shown the existence of comorbidity between low bone mineral density, osteoporosis, and bone fracture in patients with dementia (67-69). AD patients have more than twice the risk of experiencing decreased bone density and bone fracture. The connection between brain and bone occurs through the control of the autonomic nervous system over the dynamic balance of bone remodeling. The central nervous system regulates autonomic nervous system signaling on bone through the dorsal raphe nucleus and the ventromedial nucleus (VMN) of the hypothalamus. In this regard, neuroimaging studies have shown a correlation between hypothalamic atrophy in early AD patients with lower bone mineral density (BMD) (70). On the other hand, during middle age, a decrease in plasma levels of steroid hormones such as estrogens during menopause are also established risk factors for AD incidence (71). Follicle-stimulating hormone (FSH) plasma levels rise during menopause as a response to defective ovulation. High plasma FSH is linked to higher deposition of A β plaques and the formation of tau NFTs in the hippocampus and cortex accelerating cognitive decline (72).

One of the mechanisms described for the reduction of A β load in the brain occurs via systemic circulation, implying its elimination in organs such as the liver, kidneys, or gastrointestinal tract. This mechanism begins through the binding of the A β peptide to APOE, forming a complex that crosses the blood-brain barrier thanks to the binding of APOE to the LRP1 receptor (33). Indeed, the removal of A β in the periphery reduces the A β load in the brain (73). In fact, it has been seen that A β degradation in liver extracts from AD patients is lower than in that of patients without AD, pointing to a relationship between liver dysfunction and amyloid pathology, in a cause-effect

relationship (74). Furthermore, increased hepatic degradation of A β prevents cognitive impairment in murine models of AD (75).

The contribution of the liver to A β clearance suggests that the incidence of liver problems could be a risk indicator for AD. In animal models, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) been linked to AD, producing neuroinflammation and accumulation of A β plaques (76). Indeed, it has been observed in the 5xFAD murine model of AD that overexpression of human A β in the liver causes cognitive impairment and hepatic fat accumulation, suggesting a role for A β in hepatic metabolism that could contribute to the development of NAFLD (77). In addition to NAFLD, other liver pathologies such as cirrhosis or inflammation caused by hepatitis B virus also decrease the hepatic capacity to clear A β and could be associated with an increased risk of AD (78, 79). The fact that hepatic dysfunction and loss of systemic A β clearance capacity in the liver is a risk factor for AD provides an opportunity for a liver-directed pharmacological intervention to treat AD from a non-brain-oriented perspective, focusing on metabolic health as a compelling factor in the development of AD.

Currently, there are several clinical trials based on the use of drugs that have insulin as a target for the treatment of AD. Anti-diabetic drugs such as metformin or intranasal insulin itself, have shown mixed results so far. The use of these pharmacological treatments also entails certain challenges associated with their safety, bioavailability, and undesirable secondary effects. The need arises for a pharmacological approach that can be administered safely, is manageable for the patient, and has a well-described mechanism of action. One of the proposed alternatives is the use of nutraceuticals such as DCI, a natural compound incorporated found in soy and plants and an intermediate of the non-canonical insulin signaling pathway, which promotes insulin secretion, exerts antioxidant and anti-inflammatory activity and has long been safely used for the treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS). The incorporation of DCI into membrane phospholipids forming inositol phosphoglycans (IPGs) makes them substrates for phospholipase D (PLD) activity, which can mediate the activation of non-canonical insulin pathways leading to IRS1 and IRS2 phosphorylation (80). DCI is able to activate per se the PI3K/AKT pathway and plays a crucial role in insulin activity (4). Administration of DCI and its 3-O-methyl derivate, D-Pinitol (DPIN) promote insulin release in a mechanism similar to that produced by glucose in β -pancreatic cells (81-83). The administration of DPIN and DCI, in addition, prevent weight loss produced in insulin-deficient animal models, promote lipogenesis in adipocytes synergistically with estrogens, and exert a hepatoprotective mechanism (84-86).

it has been observed that DCI or its analog DPIN act on several common targets in Alzheimer's disease. Centrally, DCI is transported across the blood-brain barrier, promoting insulin signaling in the brain. In vitro studies in hippocampal neurons have shown that DCI stimulates insulin signaling, decreasing the toxicity of soluble A β oligomers in neurites (1). DPIN, in turn, has further been shown to have selective γ -secretase inhibitory activity decreasing APP, but not notch, processing. Furthermore, orally administered DPIN is able to decrease tau hyperphosphorylation in rodents in a mechanism associated with reduced activity of CDK5, a tau protein kinase (87, 88). DPIN has been shown to be effective in reversing metabolic imbalances resulting from insulin deficiency, such as weight loss depicted in murine models of streptozotocin (STZ) injection-induced diabetes (84). These results suggest that DCI has therapeutic potential as a treatment in early metabolic impairment of insulin signaling and the development of vascular dysfunction, which promote oxidative stress and proinflammatory cytokine release, ultimately contributing to amyloid pathology in the context of brain insulin resistance in AD.

In order to study the effectiveness of targeted therapies to slow down the progression of AD, over the past 20 years, murine models carrying familial AD mutations in *APP* and *PS1* genes have been created. The goal of these animal models is to closely mimic the pathology of AD.

The mouse model provides several benefits, including a short life cycle, simplicity of handling and maintenance, physiological resemblance to humans, and adaptability to small space conditions. These animal models try to reproduce the pathological alterations of AD; however, they are not able to reproduce with full fidelity the amyloid pathology both at the biological level and in the cognitive characteristics developed. Most animal models based on combined *APP* and *PS1* mutations promote generation of $A\beta_{1-42}$ fragments and the formation of diffuse and senile plaques (13-15). The 5xFAD mice co-express and co-inherit familial Alzheimer's disease (FAD) mutant forms of human transgenes for *APP* (the Swedish mutation: K670N, M671L; the Florida mutation: 1716 V; the London mutation: V717I) and *PS1* (M146L; L286V) under transcriptional control of the neuron-specific mouse *Thy-1* promoter (14). These mice show the greatest similarity in cellular and molecular events in human amyloid pathology (14); hence we chose the 5xFAD mouse model of AD to study the metabolic disturbances occurring during the initial stages of AD that could contribute to amyloid-derived cognitive decline. The study of these metabolic changes could provide information for the detection of possible early metabolic biomarkers indicative of the development of Alzheimer's pathology. Knowing the mechanisms through which these metabolic changes occur is necessary to establish the pathway of action and the efficacy of therapeutic strategies such as the use of DCI as a treatment for loss of insulin signaling and metabolic imbalance.

1.3 Hypothesis and aims of the study

The **general hypothesis** of this doctoral thesis is that the metabolic alterations that occur during AD's course could influence the processes of neuroinflammation and neurodegeneration of amyloid pathology. These metabolic disorders could be an early marker of the disease itself, being an effective target for its treatment, so it is of great importance to describe which are the cellular and molecular events that derive from them. The use of DCI, a natural compound that promotes insulin signaling and has anti-inflammatory and antioxidant properties, could represent a therapeutic alternative to slow the process of metabolic and cognitive deterioration in Alzheimer's disease.

Therefore, the **main objective** of this work is to physiologically characterize the metabolic changes that occur during the development of Alzheimer's disease in a humanized model of AD, the 5xFAD mouse. In doing so, identifying, and describing targets such as altered body weight, loss of insulin signaling, and other hormonal changes, and characterizing the pathology in the hypothalamus, the region responsible for the control of energy balance, are necessary objectives to determine the efficacy of DCI treatment in slowing the progression of AD. Therefore, the following specific objectives are proposed:

1. **Objective 1.** Description of the mechanism of action of DCI on insulin signaling, anti-inflammatory, and antioxidant activity, and possible therapeutic targets in Alzheimer's disease.
 - 1.1 A literature review of all available data on the biological activity of DCI and other inositol analogues, including data from clinical trials and patents generated for their use in neurodegenerative diseases and Alzheimer's disease, will be performed.
 - 1.2 The pharmacodynamics and pharmacokinetics of DCI will be described in a rat model, in a subacute administration, where its effect on insulin sensitizing in a glucose tolerance test and plasma metabolite levels in a biochemical analysis will be determined. This work will be carried out in collaboration with the Biotechnology company Euronutra S.L. in a one-year research stay.
 - 1.3 Collaboration in the study of the effect of DCI and DPIN administration on plasma concentrations of glucose and hormones that regulate glucose homeostasis (insulin, glucagon, and ghrelin), and the effects of DPIN on plasma concentrations of pituitary hormones (growth hormone (GH), prolactin, thyrotropin (TSH), luteinizing hormone (LH) and FSH) in human volunteers. This work will be carried out in collaboration with the biotechnology company Euronutra S.L. in a one-year research stay.
2. **Objective 2.** Characterization of the metabolic dysregulation phenotype in a model of Alzheimer's disease, the 5xFAD mouse, at an initial age of 6 months, in which early signs of cognitive impairment and amyloid pathology can be observed.
 - 2.1 The homozygous Tg5xFAD/5xFAD mutant phenotype and the heterozygous Tg5xFAD/- will be compared to determine the penetrance in metabolism of the introduced mutations (which have a cumulative gene dosage effect for APP and PS1 production). Males and females will also be used to determine possible differences in auxological and metabolic parameters that are due to sex.

- 2.2 It will be determined if the 5xFAD animals present an alteration in body weight, in addition to changes in the pattern of intake and energy expenditure by means of indirect calorimetry, which explain the energy balance observed.
 - 2.3 The presence or absence of plaques in the hypothalamus of 5xFAD animals will be determined by immunohistochemical techniques to rule out amyloid pathology in the hypothalamic region and compared with the hippocampus, a region that has already been described as harboring A β plaques in this animal model at 6 months of age. The presence of inflammatory response in the hypothalamus will also be determined by molecular biology techniques.
 - 2.4 Plasma metabolic hormone levels of 5xFAD mice will be determined and the activation status of hormone receptors and signaling pathways in the hypothalamus will be measured, establishing a relationship between hormone dysregulation and body weight of 5xFAD mice.
- 3. Objective 3.** To study the efficacy of dietary supplementation of DCI for 4 months, from 6-7 months to 10 months in homozygous 5xFAD males and females, to reverse or palliate the metabolic and cognitive alterations on the targets identified in the 5xFAD model. Additional metabolic alterations will also be observed as mice age.
- 3.1 The effect of DCI on auxological parameters of body weight, intake pattern and energy expenditure will be determined by indirect calorimetry. The effect of DCI on cognitive impairment of 5xFAD mice will also be assessed by behavioral tests of short-term working memory and learning memory.
 - 3.2 The efficacy of the DCI in restoring normal insulin signaling and altered hormonal parameters in the 5xFAD mouse and the impact of these on the differential metabolic dysregulation phenotype between males and females will be evaluated.
 - 3.3 The anti-inflammatory capacity of DCI in the hypothalamus and the effect on altered levels of hypothalamic neuropeptides controlling energy balance will be determined.
 - 3.4 The hepatoprotective capacity of DCI in the 5xFAD female-specific fatty acid accumulation pathology associated with A β accumulation and hormonal changes will be evaluated.
 - 3.5 The ability of DCI to reverse the 5xFAD female-specific bone mass loss associated with hormonal changes and premature aging and menopause will be determined.

1.4 Material and methods

1.4.1 Animals and treatment

The animals used are: Wistar rats and male and female 5xFAD-type transgenic mice in heterozygosis ($Tg^{5xFAD/+}$) and homozygosis ($Tg^{5xFAD75xFAD}$, also simplified as 5xFAD), as well as their non-transgenic littermates as controls (non-Tg). The 5xFAD transgenic mouse model carries 5 frequent mutations in familial Alzheimer's disease (FAD). 5xFAD mice co-express and co-inherit familial Alzheimer's disease (FAD) mutant forms of human transgenes for APP (the Swedish mutation: K670N, M671L; the Florida mutation: 1716 V; the London mutation: V717I) and PSI (M146L; L286V) under transcriptional control of the neuron-specific mouse Thy-1 promoter (Tg6799 line) (14). 5xFAD lines (B6/SJL genetic background) were maintained by crossing heterozygous transgenic mice with B6/SJL F1 breeders (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Wild-type non-Tg littermate mice served as control, given the absence of A β deposition in the brain at 6 months of age (a hallmark of 5xFAD mice) and lack of cognitive impairment and metabolic imbalances. All animal models were already available at the Animal Experimentation Center of the University of Malaga. A standard rodent diet (STD, 2.9 kcal/g) was used, the latter used in the heterozygous model to determine the deleterious effect of diet on cognitive impairment in a partial Alzheimer's model. The compound DCI, supplied by the company Euronutra S.L. (<https://www.euronutra.com>) in the form of fine crystalline powder, was supplemented. For the 5xFAD model, the compound was dissolved in water and administered *ad libitum* orally at a concentration of 200 mg/kg, based on preliminary data, from 6 to 10 months of age to assess metabolic and cognitive decline in middle-aged mice. The DCI was administered via gavage to Wistar rats at 100 mg/kg for 10 days in a subacute study.

1.4.2 Physiological, metabolic, and behavioral analysis

During the period from 6 to 10 months of age, we evaluated the body weight of male and female 5xFAD mice weekly. We also evaluated daily food intake, energy expenditure, respiratory quotient and locomotor activity (Panlab Oxilet indirect calorimetry) at 6 and 10 months of age. All animals were used for behavioral testing at basal age and during treatment:

- Novel object recognition (NOR), to analyze activity (locomotion), anxiety and long-term memory. Evaluated at 6 months of age (before DCI treatment).
- Y-maze (YM), to analyze short-term memory. Evaluated at 6 and 8 months of age (before and during DCI treatment).
- Elevated-plus maze (EPM), for analyzing anxiety from another parameter. Evaluated at 6 months of age (before DCI treatment).
- Morris water maze (MWM), to analyze working memory, short term memory, long term memory and plasticity to create new memories. Evaluated at 8 months of age (during DCI treatment).

1.4.3 Molecular and histological analysis

All animals in the 5xFAD study were sacrificed at 6 and 10 months of age with sodium pentobarbital (150 mg/kg, intraperitoneally). Blood was drawn directly from the right atrium.

- Samples for histology were obtained from the left hemisphere of the brain and liver. Samples for biochemical analysis were also obtained from the right hemisphere of the brain, liver, white fat, and femurs.
- Specific protein levels were analyzed by western blot, determining the expression of proteins related to inflammation, oxidative stress, lipid metabolism, insulin signaling pathway, leptin, GSK-3 β and tau.
- Presence of A β , GFAP and IBA1 staining were assessed by immunohistochemistry and immunofluorescence at 6 and 10 months of age in hippocampal and hypothalamic sections (30 μ m) cut with a cryostat. Free-floating coronal sections containing the mouse hypothalamus and hippocampus were selected from - 1.22 to - 1.94 mm of Bregma levels.
- The expression of specific neuropeptides responsible for the control of intake and circadian activity in the hypothalamus was determined by qPCR.
- Basal levels of a panel of hormones regulating energy balance were determined using an ELISA-multiplex system (based on magnetic bead technology): insulin, leptin, glucagon, ghrelin, GLP-1, resistin, GIP and PAI-1.
- An analysis of plasma biochemical parameters (glucose, free fatty acids, triglycerides, cholesterol, creatinine, urea, uric acid and transaminases) was performed to determine possible liver damage that could affect the animal's metabolism.
- Fat content in the liver was determined by total fatty acid extraction. Samples from the left lateral lobe of the liver were cut into sections of 5 μ m of thickness. Liver morphology was assessed with hematoxylin-eosin staining, and presence of amyloid deposits were determined by Congo Red staining.
- Morphometric and porosity analysis of trabecular and cortical bone of 5xFAD mouse femurs treated with DCI at 10 months of age was assessed by micro-computerized tomography (micro-CT).

1.5 Results and discussion

In this Ph.D. work, we characterized those parameters related to metabolism, endocrine signaling and energy balance that are altered in the 5xFAD mouse, a murine model that generates a sequential A β accumulation in the brain similar to that observed in AD patients and that reproduces those associated pathological features such as synaptic dystrophy, immune and neuroinflammatory response and neuronal death. Epidemiological studies increasingly indicate that changes occur at the physiological level at a prodromal or early stage of AD, which are indicative of the development of the disease. However, the events at the molecular and cellular level that trigger these mechanisms are still unknown. Moreover, the interrelationship of these problems is still unclear. One of the proposals of this group is the use of DCI, a natural compound of vegetable origin and obtained through the diet, which interacts with several of the proposed targets, since it promotes insulin signaling in the organism, exerts hepatoprotective mechanisms and possesses anti-inflammatory and antioxidant properties. Its oral route of administration, the safety of its use and its ability to cross the blood-brain barrier make it an ideal candidate as a treatment to slow the development of AD.

1.5.1 Preliminary results

A preliminary pharmacodynamic study of subacute oral administration of DCI at a dose of 100 mg/kg in male Wistar rats for 10 days was performed to determine its ability to promote insulin signaling in a glucose tolerance test and its effect on the parameters of a biochemical analysis was analyzed, demonstrating safety in its use. The DCI-treated rats manifested an increase in high density lipoprotein cholesterol levels (HDL), and a decrease in low density lipoprotein (LDL) cholesterol levels, resulting in an improved plasma lipid profile. An increase in plasma bilirubin was also observed, not associated with hepatotoxicity parameters such as urea or transaminase enzymes, so this result suggests that the DCI promotes the release of bilirubin, which is a molecule with potent antioxidant activity in the body. The glucose tolerance test showed a significant effect of the DCI in decreasing glucose levels between 5 and 60 minutes after the glucose bolus with respect to the control group, which reaffirms that the DCI is able to promote insulin release and signaling when administered continuously.

1.5.2 Study 1: The biomedical uses of inositols: a nutraceutical approach to metabolic dysfunction in aging and neurodegenerative diseases

In the first study, we conducted a literature review on the role of DCI in the insulin signaling pathway, and the mechanisms through which DCI is involved in inflammation processes, oxidative stress and endothelial dysfunction were described, also identifying potential therapeutic targets for the treatment of AD. The DCI is part of the family of inositols, 6-carbon alicyclic polyols with a sugar-like structure, present both in cellular fluids and in the phospholipids and glycans of plasma membranes, either incorporated into IPGs (elements of the outer leaflet of the plasma membrane that can serve as anchors for proteins) or phosphatidylinositols (PIs) (responsible for membrane trafficking and intracellular signaling). Inositols are involved in multiple physiological functions (89, 90). Inositols can be incorporated through the diet (89), or synthesized by the body. The DCI can be obtained from its analog myo-inositol through the action of an epimerase (91, 92). DCI can also be obtained through acid demethylation produced in the stomach of its 3-O-methylated analog, DPIN, which is found in large amounts in products such as soybeans and wheat. These molecules can be derived from

biotechnological processes of plant extraction and fermentation, as remnants of food production. During my Ph.D. thesis, I carried out a one-year research stay in the biotechnological company Euronutra S.L., where I participated in pharmacokinetic trials of DCI and DPIN in humans and in the process of obtaining DCI from carob pods in a padlock industrial process without the use of polluting organic solvents.

DCI exhibits some insulin-like activities, such as stimulation of lipogenesis, glucose transport, and glycogen synthesis (80), and alterations in inositol metabolism play an important role in diseases involving insulin resistance, such as diabetes and polycystic ovary syndrome (7). In our study, we have defined that DCI is able to act on insulin signaling in three ways: 1) by acting in the form of inositol-glucan, a pseudodisaccharide consisting of galactosamine and 3-O-methylated DCI (DPIN) in a β -1,4 bond; which is an allosteric modulator of PP2C and PDH; 2) stimulating insulin signaling through the non-canonical pathway, in the form of membrane-anchored IPGs whose release stimulated by an insulin-activated PLD promotes signaling of proteins such as pp59Lyn on IRS1, second messengers of the insulin receptor; and 3) modulating direct insulin secretion in a mechanism similar to that produced by glucose in β -pancreatic cells (81-83).

In addition to promoting insulin signaling, DCI and its analog DPIN have been found to promote the activity of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST), in addition to decreasing the inflammatory response and the secretion of cytokines such as TNF- α or IL-1 β (93-98). DCI and its analog DPIN have proven to be potential pharmacological tools due to their positive effects in different pathologies: anticancer (97), antidiabetic (99), antioxidant (98), hepatoprotective (85, 100), immunosuppressant (101), antiosteoporosis (102, 103), antiaging (26) and brain disorders associated with insulin resistance, such as Alzheimer's disease (AD) (1, 87, 104).

Since DCI is known to cross the blood-brain barrier and its presence in the brain has been described, researchers have been examining the impact of treatment with DCI and its analogues on the molecular features of AD (A formation and accumulation, tau hyperphosphorylation, or neuronal death). DCI has been found to be able to decrease the toxicity of soluble A β oligomers in hippocampal neurons *in vitro* by decreasing their binding to the lipid membrane and preventing the formation of dystrophic neurites, via a mechanism involving intracellular insulin signaling. Other recent studies have suggested that DPIN, is able to decrease APP processing by γ -secretase reducing A β formation without modulating processing of notch, thus suggesting that DPIN could partially modulate the amyloidogenic pathway of A β production. However, the mechanism through which this effect occurs is still unknown. DPIN has so far formed part of two phase 2 clinical trials, in which it was administered (under the name NIC5-15) to patients with moderate AD, claiming potential γ -secretase inhibition and insulin sensitizing activity. This study showed stabilization of cognition as determined by the ADAS-Cog test in AD patients (26). However, no phase 3 study has been reported to date.

DCI has been shown to have an anti-aging effect in *Drosophila melanogaster* through increased insulin signaling and regulation of autophagy mechanisms, which are disrupted during aging and cell death (105, 106). It has also been reported that DCI prevents neuronal damage and axon degeneration through a mechanism associated with decreased oxidative stress in insulin-deficient mice (107). On the other hand, it has been shown in microglial cell cultures that DPIN inhibits the inflammatory response by reducing the production of ROS, NOS, prostaglandins and the expression of inflammatory cytokine expression such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 in a mechanism associated with TREM2 activation and NF- κ B inhibition (108).

In this PhD Thesis work, I collaborated in a study of the action of DPIN on tau phosphorylation in relation to insulin signaling-mediated inhibition of tau protein kinases GSK-3 β or CDK5 (51, 109). In this study we described the ability of DCI and DPIN to modulate and decrease tau phosphorylation in the hippocampus of rats and the 3xTg mouse model of AD, implying a mechanism associated with CDK5 inhibition independently of GSK-3 β and any tau regulatory protein kinase. This work was recently published (88) and allowed us to file the patent "Composition for preventing and treating tauopathies" WO2021048195A9, registered in China, Japan, Canada, the United States and Europe (110). This work implies that DCI has multiple targets in AD associated with its mechanism of action.

We have approached AD from the point of view of the early stages of the disease, as the aging process is closely related to the development of metabolic dysregulations leading to insulin resistance, where inositols could have a potential beneficial use. This comprehensive review of the physiological role of inositols helps us to understand what benefits their external administration may bring. The fact that the last decade has seen an increase in the number of patents and the start of clinical trials on the use of inositols such as DCI or its analogues in AD responds to a need and opens an avenue for expansion in the use of inositols as a potential treatment. The description of the mechanisms of metabolic dysregulation occurring in AD patients associated with an imbalance of insulin signaling and associated inflammatory processes are vital to evaluate the efficacy of the DCI.

1.5.3 Study 2: A Negative Energy Balance Is Associated with Metabolic Dysfunctions in the Hypothalamus of a Humanized Preclinical Model of Alzheimer's Disease, the 5xFAD Mouse

We chose the 5xFAD mouse model of AD to study early manifestations of metabolic imbalances to understand the pathophysiological processes occurring in the early stages of AD. We aimed to determine potential targets for DCI treatment, thereby allowing for later evaluation of a possible DCI treatment in 5xFAD mice. Therefore, the phenotype of metabolic dysregulation was characterized in a model of Alzheimer's disease, the 5xFAD mouse, using both males and females in heterozygosis (Tg^{5xFAD/-}) and homozygosis (Tg^{5xFAD/5xFAD}, also simplified as 5xFAD) for the AD mutations, at an initial age of 6 months in which early signs of cognitive impairment and amyloid pathology can be observed.

Tg^{5xFAD/-} and Tg^{5xFAD/5xFAD} mice depict weight loss, which is primarily due to a decrease in food intake, partially compensated by a decrease in energy expenditure in an adaptive mechanism of the organism, as indicated by metabolic cages. Immunohistochemical analysis showed no traces of A β plaque formation in the hypothalamus, the main regulatory center for energy balance controlling food intake and energy expenditure. Using western blot and qPCR techniques, it was determined that there is, however, an activation of the glial population and an inflammatory response in the hypothalamus of 5xFAD animals, shown by higher total levels of GFAP (astrocytic reactivity), IBA1 (microglia activation), IL-1 β or TNF- α . These results suggest that the inflammatory response in the hypothalamus could be associated with the presence of soluble A β oligomers not detectable in immunohistochemistry and/or, with other metabolic processes. In a correlation analysis, the inflammatory process was shown to be related to lower body weight specifically in Tg^{5xFAD/-} and Tg^{5xFAD/5xFAD} females. The 3xTg mouse model of AD also shows elevated gene expression of *Il1b*, *Tnf* and *Il6* in the hypothalamus (111, 112). It has been claimed that both IL-1 β and TNF- α participate in altering energy homeostasis in the hypothalamus, such

that, in the ARC of the hypothalamus, IL-1 β can cause hypophagia and decrease body weight (63), whereas it has been shown that TNF- α in the hypothalamus can cause decreased energy expenditure and insulin resistance (113). The fact that the APP and PS1 transgenes in the 5xFAD model are controlled by the Thy1 promoter (also known as CD90), which is neuron-specific, leads us to think that the hypothalamus could be overproducing A β , despite absence of amyloid plaques. For this reason, we cannot exclude the possibility that oligomeric soluble forms of A β could be the cause of a possible alteration of hypothalamic function. Since we also found an increase in tau phosphorylation in the hypothalamus of 5xFAD mice, without promoting a hyperphosphorylated state of tau, this suggests that there could be the presence of oligomers and soluble forms of A β triggering the inflammatory response (114).

Since brain insulin resistance is a pattern observed in mouse models of AD and A β expression has been observed in other peripheral regions such as the pancreas and gastrointestinal tract, we wanted to determine whether a possible alteration of plasma levels of insulin, adipokines or hormones involved in insulin secretion could be related to a deficient response of the hypothalamus, whose inflammatory process could also exacerbate a deficient response to these hormones reflecting poor management of energy balance and weight loss. ELISA multiplex assay depicted lower plasma levels of insulin, ghrelin, GLP-1, and GIP in Tg^{5xFAD/-} and Tg^{5xFAD/5xFAD} mice, as well as dysregulation of insulin and leptin signaling in the hypothalamus. This was reflected in the changes found in the pattern of intake and metabolic expenditure, there being a correlation between lower plasma levels of insulin, GIP, and GLP-1 with lower body weight in Tg^{5xFAD/-} and Tg^{5xFAD/5xFAD} mice. Follow-up studies in humans have highlighted the predictive value of fasting plasma insulin in AD. There is a U-shaped association of increased risk of dementia in patients with either non-normal high or low plasma insulin (11, 115). The metabolic phenotype of 5xFAD mice at 6 months of age was accompanied by decreased hypothalamic signaling of insulin, leptin, and GLP-1, as evidenced by low activity of insulin and leptin receptors and secondary messengers IRS1 and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), respectively, as well as the metabolic sensors mTOR, AMPK, and ERK, which interact in the signaling pathway of both insulin and leptin to regulate cell metabolism and hypothalamic responses hormones to cue hormonal status. Inflammation of the hypothalamus, which is seen in AD mice, is known to reduce the neuronal response to neuroendocrine signals like insulin and leptin. Both hormones are crucial neuroprotective growth factors, and it has been proven that impaired insulin, leptin, and GLP-1 signaling in the hypothalamus contributes to the progression of A β pathology. While low levels of GIP and GLP-1 may represent one of the potential causes of decreased plasma insulin levels, it's also feasible that hypoinsulinemia in 5xFAD mice is brought on by other factors, such as the presence of A β oligomers in the pancreas, as it has been depicted in the 3xTg mouse model of AD, contributing to β -pancreatic cell loss and lower plasma insulin levels (116, 117).

In addition, the transgenic animals had lower expression levels of the orexigenic neuropeptides *Npy* and *Agrp*, as well as altered levels of the neuropeptide's *orexin* and *Mch*, which are responsible for determining circadian regulation of appetite. It has been described that the presence of A β fragments causes the expression of *Npy* to decrease in brain slices from Tg2576 mice models of AD (118). Moreover, a lower expression of *Npy*, *Agrp*, *Pomc* and *Cartpt* has already been described in Tg2576 mice, whereas another study revealed an increased expression of inflammatory genes in the hypothalamus of 3xTg mice, which were related to lower levels of *Agrp* and *Pomc* (63, 119). Decreased levels of the neuropeptide NPY have been detected in the cerebral cortex region, amygdala, as well as in plasma in human AD patients, which is linked to neuroprotection and stress (120-123). It is conceivable that an underlying

amyloid pathology might alter the expression and release of hypothalamic neuropeptides involved in control of energy homeostasis, provoking a neuroinflammatory state that would alter the response of hypothalamic neurons as the center integrating information on the energy state of the organism.

We also conducted a biochemical analysis of lipidic molecules and metabolites in plasma, since population studies have long linked altered TAGs and cholesterol with higher risk of AD. We found that TAGs, LDL and HDL cholesterol levels of $Tg^{5xFAD/5xFAD}$ mice were altered, with sexual dimorphism being more pronounced in females. Hepatic transaminase GOT levels were also elevated, suggesting a potential liver dysfunction, which could be contributing to cognitive impairment by impaired clearance of peripheral $A\beta$. Patients with lower insulin and low BMI also depict decreased plasma TAGs, while other studies notices a significant association between weight loss and plasma TAG levels as factors of AD risk, as well as a tendency for decreased plasma cholesterol (11, 124).

These results highlight that the 5xFAD animal model reproduces several of the metabolic alterations defined as risk factors for Alzheimer's disease in middle age, which could be potential targets for DCI treatment.

1.5.4 Dietary administration of D-chiro-inositol attenuates sex-specific metabolic imbalances in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease

The characterization of the cellular and molecular mechanisms that derive in a metabolic dysregulation phenotype of 5xFAD mice allowed us to define those targets susceptible to be evaluated with DCI treatment. Therefore, we subsequently evaluated the ability of DCI to reverse the negative energy balance by acting on the insulin signaling pathway, hypothalamic inflammation, and liver pathology, which was detected at older ages in 5xFAD females. A treatment of DCI administered orally in the drinking water at a dose of 200 mg/kg (150 mg/L, with an average consumption of 4 mL daily in a mouse weighing 30g) was defined, in homozygous male and female animals (now simplified as 5xFAD), for 4 months, from 6 to 10 months of age.

In the auxological follow-up of 5xFAD animals treated with DCI from 6 to 10 months of age, a progressive weight loss of 5xFAD mice compared to their non-transgenic littermates was observed. DCI treatment of 5xFAD male and females for 4 months prevented weight loss, due to an increase in food intake, which was in turn reflected in higher energy expenditure. In addition to normalizing the metabolic deficit, it was observed that DCI treatment slowed the progression of cognitive impairment in short-term memory processes, as observed at 2 months of treatment in the Y-maze (YM) test, as well as cognitive flexibility determined in the Morris water maze (MWM).

Based on previous data depicting altered hormone secretion in 5xFAD mice at 6 months of age we evaluated the effect of DCI administration on plasma metabolic hormone profile, as well as pituitary-released hormones such as GH, FSH or LH. In summary, DCI administration restored normal plasma values of insulin, GIP, and GLP-1 (which were decreased in 5xFAD mice), as well as normalizing abnormally elevated plasma FSH in 5xFAD females, indicative of menopause associated with premature aging, as well as BDNF, a trophic factor whose rise in plasma are associated with an early stage of cognitive impairment and an inflammatory response. DCI

treatment also evidenced a rise in plasma TAGs, which could in turn be a result of increased white adipose tissue mass.

The ability of DCI to normalize plasma insulin levels in 5xFAD mice reside in several factors. Some research indicates that DCI, in addition to being an insulin sensitizer and decreasing insulin requirement during ingestion, is able to promote β -pancreatic cell activity and stimulate insulin release via allosteric modulation of PP2C, which in turns activates ATP-modulated potassium channels (K_{ATP}) (81, 125). It is also feasible that DCI might restore insulin secretion by preventing the binding of A β oligomers to pancreatic cells, preserving pancreatic islet functionality, and/or preventing cell damage caused by oxidative stress, as previously shown in pancreatic islets from STZ-injected rat and mouse models of diabetes (24, 134-136). Regarding GIP and GLP-1, previous research has proven that supplementation with DPIN replenishes the abundance of gut bacteria associated with glycemic control in diabetic rats, so that DCI supplementation could infer on the microbiome of 5xFAD mice in a mechanism involving deficient production of GIP and GLP-1. In support of this hypothesis, there is evidence of amyloidosis in the gut of 3xTg mice, as well as impaired GLP-1 and GIP secretion in late life (116, 117). Since elevated FSH is negatively associated with low plasma insulin in menopause, it is feasible that DCI may regulate FSH levels indirectly through restatement of insulin signaling (126). In a pharmacokinetic study recently published by our group acute administration of DPIN in humans decreased plasma FSH levels non-significantly, supporting the fact that DCI could reverse elevated FSH levels via an alternative mechanism (127). Given that BDNF was associated with the inflammatory response observed in the hypothalamus (specifically with GFAP), it is possible that the reduction in plasma BDNF associated with DCI treatment in female 5xFAD mice is derived from its anti-inflammatory activity.

In a closer look into the hypothalamus, DCI was able to reverse the increased expression of *Igf1* (which is secreted by astrocytes in the brain) and *Gfap* (also decreasing astrocyte GFAP immunoreactivity observed by immunofluorescence). This hypothalamic astrocytic reactivity was associated, in turn, with decreased expression of neuropeptides such as *Npy* and *Agrp*, leading to low food intake, weight loss and abnormal deficiencies on the plasma levels of insulin and its secretagogues. It is possible that hypothalamic inflammation and astrocyte activation in 5xFAD mice is triggered by the presence of A β oligomers in the hypothalamus undetected by immunohistochemistry. Since it has been observed that DCI is able to decrease the neurotoxicity associated with A β oligomers, it is possible that this is one of the mechanisms by which DCI restores hypothalamic control of energy balance (1).

One of the peripheral organs responsible for eliminating A β is the liver and there are studies linking liver damage to elevated A β levels. After observing signs of liver damage in 5xFAD females at 6 months of age, which could influence amyloid pathology, the metabolic status of the liver was determined through the analysis of fat content by total fatty acid extraction, in addition to determining the expression of genes involved in the lipogenesis, lipolysis, inflammatory response and oxidative stress pathways. It was observed that 5xFAD females showed abnormal fatty acid accumulation in the liver, despite lower body weight, and increased gene expression of factors involved in lipogenesis and β -oxidation of fatty acids, evidencing a response to hepatic fatty acid accumulation. This was accompanied by elevated plasma levels of the liver enzymes glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT), an increase in which indicates possible liver damage. Treatment with DCI showed a significant decrease in fatty acid accumulation in the liver of 5xFAD females, evidencing a hepatoprotective effect. Interestingly, in 5xFAD females, fatty acid deposition in

the liver was associated with decreased plasma insulin and, in turn, with increased plasma FSH and BDNF. Insulin resistance is one of the features shown in lipodystrophy, where ectopic fat distribution occurs outside the white adipose tissue, due to deficient hormone-sensitive lipase (HSL) activity, which is activated by insulin in fat tissue, resulting in fatty acid accumulation in the liver (128). It has been shown that there is an association between plasma FSH levels and the prevalence of fatty liver (129), while on the other hand, elevated FSH levels promote lipogenesis through the activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) (130). Since abnormally low plasma insulin levels were associated with fatty acid accumulation in the liver, similar to ectopic fat deposition in T1DM mouse models (131), we observed that DCI administration increased the activation of the insulin receptor (IR β) and its second messenger (IRS1) in the liver of 5xFAD females, which was associated with lower hepatic fat content.

These results support the efficacy of DCI as a nutraceutical treatment that prevents metabolic and cognitive decline in an animal model of AD. The DCI restores the loss of insulin signaling, decreases inflammation shown in the hypothalamus restoring energy balance and decreases fatty liver-associated liver damage specifically in 5xFAD females.

1.5.5 Complementary results: efficacy of DCI administration in amyloid pathology in the liver and osteoporotic phenotype in 5xFAD female mice

Given the association of AD risk and comorbidity with hepatic steatosis, we sought to determine the presence of amyloidosis in the liver of 5xFAD mice, assessing the possible hepatoprotective effects of oral administration of DCI. In a histochemical analysis, we were able to observe the presence of amyloid plaques in the liver of 5xFAD mice. Interestingly, amyloid plaque count was directly associated with increased hepatic fatty acid content in 5xFAD females, but also with lower plasma insulin levels. It is known that insulin signaling promotes A β clearance (147), suggesting that A β protein accumulation directly interferes with hepatic metabolism in the 5xFAD model, aggravating the previously observed metabolic defects. 5xFAD females treated with DCI had a lower number of amyloid plaques, suggesting that DCI interfered with A β plaque accumulation, possibly through insulin re-sensitization (132-135).

Although DCI can prevent toxicity caused by the binding of diffusible A β oligomers in neurons *in vitro*, no studies have been conducted on its efficacy in systemic A β clearance. Consequently, future research on this topic could describe a potential mechanism to prevent systemic inflammation and toxicity caused by Alzheimer's disease. Given our results, overall, DCI treatment is able to partially restore metabolic flux in the liver of 5xFAD females.

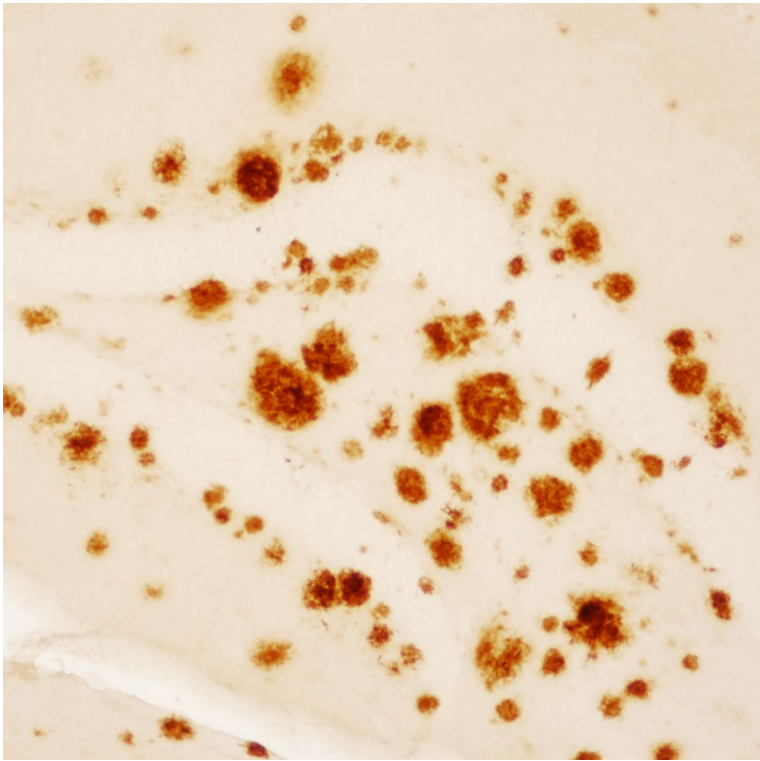
Bone density and structure are altered during aging, so that bones become more fragile and may break more easily. Patients with AD have an increased risk of fracture, while osteoporosis is a risk factor for the development of dementia of the Alzheimer's type, especially in women (136, 137). The loss of bone volume fraction and number of trabeculae in the femur are features displayed during the aging processes, which were displayed by 5xFAD females at 10 months of age, indicating an osteoporotic phenotype (138). Female-specific microarchitecture alterations were related to low plasma insulin.

Although evidence of pathological accumulation of A β in the bone of AD patients is scarce, AD-related genes such as APP are expressed in the bone of AD patients and associated as well with the expression of genes involved in bone resorption, suggesting a common pattern between

neurodegeneration and bone loss, through amyloid pathology (139). Furthermore, the presence of A β protein inhibits the proliferation of osteoblasts *in vitro*, responsible for the deposition of new bone matrix, while facilitating the activation of osteoclasts through the activation of NF- κ B, ERK, ligand of receptor activator of NF- κ B (RANKL), *nuclear factor of activated T cells c1* (NFATc1) and calcium oscillation pathways (140, 141).

DCI supplementation from 6 to 10 months of age was able to reverse the loss of trabecular and cortical bone mass in 5xFAD females, normalizing bone microstructure parameters to those shown by non-transgenic females. Administration of DCI, as well as its analog DPIN, are able to inhibit osteoclast activity through the activity of RANKL and NFATc1 proteins and reduce the rate of bone resorption *in vitro* (102, 103). Osteoclast activity is influenced by the presence of inflammatory factors such as TNF- α , which activate the RANKL pathway, so the anti-inflammatory capacity of DCI could contribute to the decrease in the rate of bone resorption (170). On the other hand, the ability to inhibit the binding of A β oligomers to the cell surface shown by DCI could influence osteocyte activation (1, 140, 141). Efficacy of DCI treatment on preventing the osteoporotic phenotype of 5xFAD females could also be mediated by resensitization of insulin signaling, which promotes bone growth and osteocalcin formation, that stimulates insulin secretion in a positive feedback mechanism (142). Hypothalamic neuropeptides AgRP and POMC regulated bone remodeling via the sympathetic nervous system, and atrophy of the hypothalamus in AD patients could be associated with prevalence of osteoporosis (143). Therefore, DCI could also reduce bone resorption via increased *Agrp* expression in the hypothalamus as it has been evidenced in 5xFAD mice. Overall, these results suggest that DCI could be a promising treatment for osteoporosis in AD.

2. INTRODUCCIÓN



2.1 Introducción de los trabajos presentados

La presente Tesis Doctoral, recogida en un compendio de tres artículos, nace de la estrecha colaboración entre la empresa biotecnológica malagueña Euronutra S.L., el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y la Universidad de Málaga. Euronutra S.L. es una compañía biotecnológica europea activa en la investigación, desarrollo, fabricación y comercialización de ingredientes bioactivos naturales mediterráneos. De la cuenca del mediterráneo nace la algarroba, de la cual Euronutra S.L. es pionero en la extracción del compuesto D-Chiro-inositol, un componente de los fluidos y las membranas celulares cuyas funciones han sido descritas a lo largo de los años. El D-Chiro-inositol representa una oportunidad para el tratamiento de enfermedades metabólicas y neurodegenerativas, dada sus propiedades sensibilizantes de insulina, su capacidad antioxidante y antiinflamatoria. Una de las patologías prevalentes que suponen un desafío para la sociedad y la sanidad mundial es la enfermedad de Alzheimer. La dificultad para encontrar un fármaco efectivo que revierta el proceso neurodegenerativo ha llevado a dar un giro a la investigación en busca de nuevos biomarcadores que permitan identificar de forma temprana el inicio de la enfermedad y sirvan como dianas terapéuticas complementarias para el estudio y desarrollo de nuevas terapias. Cada vez hay más evidencias que apuntan a la aparición de alteraciones fisiológicas y metabólicas del organismo años antes del desarrollo de síntomas cognitivos graves, indicativas de riesgo de desarrollar Alzheimer.

2.1.1 Usos biomédicos de los inositoles

Con el objetivo de generar un enfoque sencillo, seguro y sostenible para las demencias basado en la tecnología alimentaria y farmacéutica, en el primer artículo publicado de esta Tesis Doctoral, hemos caracterizado la estructura, farmacocinética, función fisiológica, y potenciales vías de señalización a través de las cuales los inositoles, y en especial el D-Chiro-inositol podría ejercer un mecanismo de neuroprotección basado en la señalización de insulina y la neuroinflamación. Este trabajo de revisión bibliográfica recoge todos los aspectos de la investigación llevada a cabo en el campo de los inositoles y el D-Chiro-Inositol, el cual ha ganado un creciente interés en su papel en la señalización de insulina en el organismo y su actividad pleiotrópica antioxidante, antiinflamatoria, hepatoprotectora y recientemente como potencial candidato para aminorar la patología amiloide característica del Alzheimer. En este trabajo se recogen todos aquellos ensayos clínicos y patentes registradas para el uso de inositoles en el tratamiento de la demencia y la enfermedad de Alzheimer.

2.1.2 Caracterización metabólica del ratón 5xFAD modelo de Alzheimer

Dado que aún son mayormente desconocidos los mecanismos patofisiológicos que conllevan a alteraciones en el metabolismo de las personas con enfermedad de Alzheimer en estadios tempranos, como la pérdida de peso, la disfunción de la señalización de insulina y otras alteraciones endocrinas, en el segundo artículo publicado de esta Tesis Doctoral, decidimos estudiar de forma integrada el fenotipo de balance energético de un modelo animal de enfermedad de Alzheimer, el ratón 5xFAD el cual genera una patología amiloide similar a la mostrada por los humanos mediante la inclusión de mutaciones en transgenes humanos de aquellas proteínas que generan de forma aberrante la proteína amiloide. Decidimos explorar el modelo en heterocigosis y en homocigosis a una edad temprana del inicio de síntomas cognitivos para evaluar la penetrancia de la patología amiloide en la alteración del metabolismo del ratón 5xFAD. De igual forma, empleamos ratones de sexo macho y hembra, dada la mayor

prevalencia de la enfermedad de Alzheimer en las mujeres, para estudiar posibles alteraciones específicas ligadas al sexo. En este trabajo evaluamos la patología amiloide y neuroinflamatoria en el hipotálamo, la región cerebral encargada del control la homeostasis de energía, y evaluamos posibles alteraciones en los niveles plasmáticos de hormonas metabólicas incluyendo a la insulina, así como la señalización de éstas en el hipotálamo, la cual es esencial para el control hipotalámico del metabolismo periférico. Como resultado de estos experimentos, constatamos que, a pesar de la ausencia de agregaciones o placas amiloides en el hipotálamo, las cuales sí estaban presentes en otras regiones encargadas de la memoria y procesos cognitivos, se observó una neuroinflamación relacionada con una pérdida de la ingesta, derivando en menor peso corporal y un gasto energético disminuido en consecuencia. Este hecho estaba, a su vez asociado a niveles menores de insulina y sus secretagogos en plasma y una pérdida de la señalización endocrina en el hipotálamo, derivando en un balance energético negativo general. La caracterización del modelo animal 5xFAD nos permitió identificar aquellos procesos fisiológicos que podría suponer dianas terapéuticas susceptibles a la acción sensibilizante a la insulina, antioxidante y antiinflamatoria del D-Chiro-inositol.

2.1.3 Eficacia del D-Chiro-inositol en el declive metabólico y cognitivo del ratón 5xFAD modelo de Alzheimer

Tras la caracterización de fenotipo de desregulación metabólica del modelo animal 5xFAD, en el tercer artículo publicado de esta Tesis Doctoral se evaluó la eficacia del D-Chiro-inositol para el tratamiento del desbalance metabólico y cognitivo del ratón 5xFAD. En esta ocasión, se utilizó el modelo en homocigosis, tanto machos como hembras para determinar posibles efectos específicos del sexo en el avance de la patología y la efectividad del tratamiento desde los 6 hasta los 10 meses de edad. En este trabajo pudimos determinar que la neuroinflamación asociada a la respuesta de astrocitos afectaba a la secreción de neuropéptidos hipotalámicos, encargados de regular el apetito y el gasto energético. En este sentido, el D-Chiro inositol redujo parcialmente la inflamación hipotalámica, restaurando la ingesta y evitando una pérdida de peso progresiva. Este hecho fue acompañado por el freno del avance del deterioro cognitivo, de forma que el D-Chiro-inositol fue capaz de revertir aquellos cambios asociados a la pérdida de memoria de trabajo y flexibilidad cognitiva. La administración del D-Chiro-inositol normalizó los niveles excesivamente bajos de insulina y sus secretagogos en plasma, paliando el déficit metabólico patente en el modelo 5xFAD. Se observó que las hembras 5xFAD mostraban un fenotipo de hígado graso que no se daba en los machos 5xFAD. El desarrollo de hígado graso se encontraba relacionado con la señalización de insulina, la elevación de los niveles plasmáticos de la hormona foliculoestimulante, indicativa de menopausia, y a un evento neuroinflamatorio. A través del restablecimiento de la señalización de insulina y hormona foliculoestimulante y la reducción de la inflamación hepática, el D-Chiro-inositol revirtió la acumulación ectópica hepática de grasa. Gracias a estudios complementarios, pudimos comprobar que la patología hepática se encontraba asociada a amiloidosis hepática, revertida por la administración de D-Chiro-inositol. Las hembras 5xFAD también mostraron indicios de osteoporosis asociada a la señalización de insulina y revertida por la administración de D-Chiro-inositol.

La caracterización de las alteraciones metabólicas en la enfermedad de Alzheimer y la evaluación preclínica de la eficacia del D-Chiro-inositol como tratamiento abre la posibilidad de futuras líneas de investigación interdisciplinares y traslacionales para el uso de compuestos naturales como potenciales tratamientos en patologías con necesidades médicas no cubiertas como la enfermedad de Alzheimer.

2.2 Principales características y epidemiología de la enfermedad de Alzheimer a nivel mundial

A medida que aumenta la esperanza de vida de la población, los trastornos degenerativos relacionados con la edad aumentan su impacto sanitario y socioeconómico en la Salud Pública. La enfermedad de Alzheimer (EA) es un importante trastorno neurodegenerativo relacionado con la edad y la principal causa de demencia, suponiendo hasta un 60-70% de los casos de demencia en todo el mundo. Las principales características celulares y moleculares distintivas de la EA son: 1) la deposición anormal de placas extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$), que se forma a partir de la descomposición de una proteína más grande, llamada proteína precursora de amiloide, que está sujeta a la actividad proteasa de la β -secretasa (siendo predominante la isoforma de *beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1* (BACE1)) y la γ -secretasa; 2) la formación de ovillos neurofibrilares de la proteína tau, que en condiciones normales se une y estabiliza a microtúbulos, pero que, en el proceso de la EA, tau pierde su capacidad de unión a microtúbulos y se adhiere a otras moléculas de tau, formando “fibrillas” intracelulares que provocan daño neuronal y pérdida de comunicación sináptica entre neuronas (1).

En el desarrollo de la EA se observan: 1) una etapa patogénica preclínica, donde se empiezan a producir cambios a nivel celular y molecular años antes del inicio de los síntomas, seguido de 2) una etapa prodrómica de deterioro cognitivo leve, donde aparecen los primeros síntomas y signos propios de la EA que no llegan a interferir de forma significativa con el desempeño de sus actividades diarias como pueden ser problemas a la hora de encontrar palabras, ligera desorientación viso-espacial y cierto declive en el razonamiento; y por último de 3) una etapa clínica, donde se experimenta un mayor deterioro de la memoria, progresando hacia un estado moderado donde el daño producido en zonas cerebrales de control del lenguaje, razonamiento, olfato y procesamiento sensorial, deriva en severos problemas para reconocer familiares, llevar a cabo tareas simples o enfrentar situaciones nuevas, hasta que el paciente entra en un estado de total dependencia (16). La muerte se produce entre 3 y 9 años después del diagnóstico, siendo la quinta causa de muerte del mundo.

La EA afecta actualmente a 55 millones de personas en todo el mundo. Se estima que el 10% de los adultos mayores de 65 años viven actualmente con la EA y que, en los próximos 30 años, su incidencia a nivel mundial alcanzará los 152 millones (144). Por lo tanto, con el envejecimiento de la población mundial, se espera que el número de pacientes que sufren la EA aumente en el futuro, lo cual posiciona a la EA como uno de los mayores retos a los que se enfrenta la sociedad, el sistema sanitario y la economía mundial.

2.3 Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer en Andalucía y España

La Sociedad Española de Neurología (SEN) estima que actualmente podrían existir unas 800.000 personas en España con EA (145). Según la SEN, la EA y otras demencias son la segunda causa específica de muerte en España, mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que la demencia es el grupo de enfermedades que más han aumentado en mortalidad en los últimos años. Según sendos informes del Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía (IECA) y del Instituto Nacional de Estadística (INE) sobre defunciones según la causa de muerte más frecuente, en el año 2020 se registraron un total de 2.609 muertes debidas a la EA en la comunidad autónoma andaluza, ascendiendo la cifra de fallecidos a 15.571 en España, siendo

más de dos tercios de ellos mujeres. A pesar de que no se encuentran diferencias en la incidencia de demencias de tipo no Alzheimer entre hombres y mujeres, la EA afecta de forma desigual y más prevalentemente en mujeres, cuyas causas se ha sugerido que pueden deberse a una combinación de factores biológicos, hormonales, inmunológicos y a una mayor esperanza de vida.

El envejecimiento de la población en Andalucía y España provoca un ascenso progresivo e inevitable de la incidencia y morbilidad de la EA. El ascenso progresivo de la esperanza de vida afecta por igual a hombres y mujeres, teniendo una esperanza de vida mayor las mujeres que los hombres. El informe mundial de la OMS 2015 sitúa a la mujer española como la segunda del mundo en esperanza de vida después de la mujer japonesa, siendo la de mayor esperanza de vida de nuestro continente. Estos hechos tienen una gran importancia con relación a la EA y otras demencias, ya que, aunque se desconoce su etiología en la gran mayoría de casos, se sabe que una edad avanzada es el principal factor de riesgo para su aparición. Así pues, aunque pueden existir casos tempranos incluso en personas con treinta años, su mayor incidencia se produce a partir de los 65 años. El porcentaje de personas afectadas por algún tipo de demencia está alrededor del 6,5% en mayores de 65 años, incrementando conforme aumenta la edad (hasta un 13% en mayores de 80 años). A partir de un estudio de EURODEM (todavía vigente) y del Informe de Estrategia de Alzheimer en Andalucía (elaborado por la Consejería de Salud en 2017) (146); se puede estimar que en 2030 tendremos en Andalucía aproximadamente 156.683 personas afectadas de demencias. De ellas, el 70% corresponderá a demencia tipo Alzheimer.

2.4 Diagnóstico actual de la enfermedad de Alzheimer y nuevas perspectivas

Uno de los principales inconvenientes para el tratamiento de la EA es la capacidad de diagnóstico. Actualmente, el diagnóstico de la EA no familiar (ausencia de mutaciones genéticas causantes de la EA familiar) se realiza en base a tres criterios: 1) evidencia de deterioro en la memoria y/o aprendizaje; 2) observación en el tiempo de declive progresivo sin posibles mesetas o etapas de estabilización y 3) ausencia de otro tipo de patologías neurodegenerativas, cerebrovasculares u otras afecciones que puedan derivar en problemas cognitivos evidenciando una etiología mixta (17). El grado de deterioro cognitivo suele determinarse en base a la anamnesis y la puntuación obtenida en pruebas cognitivas que evalúan entre otros aspectos la memoria inmediata, la orientación temporal-espacial, el lenguaje, la capacidad de concentración, la resolución de tareas cotidianas y el grado de dependencia. Entre las pruebas que suelen utilizarse en los distintos sistemas sanitarios, se encuentra el *Mini-Mental State Examination* (MMSE), el cual es la herramienta de cribado de deterioro cognitivo utilizada mayormente en la sanidad andaluza en su versión traducida y adaptada por Lobo en 1979 (Mini-Examen Cognoscitivo (MEC)) con la ventaja de requerir un tiempo estimado de 10 minutos la prueba (147, 148). Otras pruebas ampliamente utilizados son el *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA), el *Blessed Dementia Scale* (BDS) y el *Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive* (ADAS-cog) (149, 150). Estas pruebas forman parte de un cribado realizado por el profesional sanitario y no son indicadores de diagnóstico *per se*, dado que se deben cumplir los criterios arriba mencionados, pero son la principal herramienta de seguimiento para la evaluación del deterioro cognitivo, acompañadas de otras pruebas como el índice de Barthel o el índice de Lawton Brody, que determinan el grado de autonomía de la persona para realizar actividades diarias de forma autosuficiente (151).

Las estimaciones del diagnóstico de la EA dan un 87% de mediana de sensibilidad (capacidad de diagnosticar pacientes que verdaderamente presentan la EA respecto a falsos positivos), mientras que la especificidad se reduce a una mediana del 58% (capacidad de excluir casos que no presentan la EA respecto a falsos negativos) (152). La baja especificidad en el diagnóstico de la EA resulta en un problema en el sistema sanitario a la hora de comenzar una intervención en los pacientes. El estudio histopatológico *postmortem* del cerebro de los pacientes con deterioro cognitivo es actualmente el método más aceptado para el diagnóstico certero de la EA, en el cual se observa incluso en estadios tempranos la presencia de depósitos de placas A β en el área de asociación parietal-temporal-occipital de la corteza (encargada de recibir y coordinar información visual, auditiva y somatosensorial), ovillos fibrilares de tau en el lóbulo temporal medial (incluyendo el hipocampo, parahipocampo y amígdala, encargadas de procesar información sensorial y la formación de memoria a largo plazo) y el sistema límbico (con funciones relacionadas a las emociones, el aprendizaje o la motivación para desarrollar tareas) (18). A nivel macroscópico, se puede observar una atrofia cortical y pérdida de volumen en los giros o circunvoluciones cerebrales y un incremento del espacio intraventricular, lo cual se comprende con una pérdida de la capacidad para realizar tareas relacionadas con la visión (lectura, orientación, distinción de objetos o personas), los cuales van acompañados de la patología amiloide y la hiperfosforilación de Tau anteriormente mencionadas (153). Estos cambios a nivel macroscópico pueden determinarse en vida mediante imagen de resonancia magnética (*magnetic resonance imaging (MRI)*), pero no son suficientes para determinar un diagnóstico de Alzheimer (18).

En 2011, el *National Institute on Aging and Alzheimer's Association* (NIA-AA) definió una serie de directrices para el diagnóstico de la EA según la estapa sintomática clínica (EA leve, moderado o avanzado) destinadas a ayudar en la toma de decisiones en la clínica y un punto de partida en la investigación (154-156). Entre otras propuestas, se discutió la importancia de un cambio de tendencia necesario hacia la implementación de la detección de biomarcadores como la presencia de A β en el líquido cefalorraquídeo unido al uso de técnicas de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET). En 2018, el NIA-AA llevó a cabo una actualización del trabajo publicado en 2011, en el cual se estableció un esquema unificado de clasificación para el uso de biomarcadores en la EA con propósito de la investigación, en paralelo a la práctica clínica, la cual se define por metodología observacional del progreso de deterioro cognitivo en los pacientes. Este esquema se etiqueta como "AT(N)", definiendo con la letra "A" la PET de la proteína amiloide o los niveles de A β en el líquido cefalorraquídeo, mientras de "T" se refiere a la agregación de Tau determinada por PET o la presencia de Tau hiperfosforilada en el líquido cefalorraquídeo, y la "N" a un estado de neurodegeneración o daño neuronal determinado por MRI o un estado hipometabólico de regiones corticales del cerebro determinado por PET de ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa (FDG) (157). A pesar de que el uso de biomarcadores puede crear un sesgo en el juicio clínico dada la tendencia a establecer correlaciones causales con el estado de deterioro cognitivo del paciente, el NIA-AA determina que el sistema AT(N) es flexible y permite la adición de nuevos biomarcadores en tanto que sean avalados por los estudios científicos y se encuentre disponible una metodología de detección eficaz (157), destacando su potencial como herramienta en la investigación de ensayos clínicos para el tratamiento de la EA.

2.5 Enfermedad de Alzheimer familiar y esporádica

Los casos de EA suelen clasificarse según la edad del inicio de los síntomas característicos y los antecedentes familiares de los pacientes. Cuando el paciente presenta síntomas entre los 30-50 años, se conoce como la EA de aparición temprana o EA familiar, mientras que, si el desarrollo se produce a partir de los 60 años, comprende a la EA de aparición tardía o EA esporádica.

2.5.1 Enfermedad de Alzheimer familiar

La **EA familiar** comprende entre un 1-6% de los casos de EA, y es consecuencia de una mutación monogénica dominante. Las mutaciones que derivan en Alzheimer familiar son aquellas que afectan al gen de la proteína precursora amiloide (*APP*), el gen de la presenilina 1 (*PSEN1*, también llamado PS1) y la presenilina 2 (*PSEN2*, también llamado PS2) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Genes cuya mutación deriva en una de las formas de enfermedad de Alzheimer monogénica o familiar.

| Gen | Locus cromosómico | Nº mutaciones descritas (158) | Función en el organismo (159) | Fenotipo de EA (160-162) |
|--------------|-------------------|--|---|---|
| <i>PSEN1</i> | 14q24.3 | Patogénicas: 138 Probablemente patogénicas: 150 Significado incierto: 35 | Da lugar a una proteína transmembrana (PS1), subunidad catalítica del enzima γ -secretasa, encargada de la proteólisis de diversas proteínas como notch o APP, precursor del péptido A β . Se encuentra ampliamente distribuida por la célula. | Inicio de deterioro cognitivo entre los 40 y los 50 años, con fenotipo similar a la EA esporádica y edad de fallecimiento entre los 50 y 60 años. Algunos casos presentan paraparesia espástica (mutaciones p.Pro264Leu, p.Leu173Trp ó p.Gln222His) así como ataxia cerebelosa (mutación p.Gly378Glu) |
| <i>PSEN2</i> | 1q31-q42 | Patogénicas: 7 Probablemente patogénicas: 6 Significado incierto: 46 | Da lugar a una proteína transmembrana (PS2) homóloga de PS1 (66% homología), subunidad catalítica del enzima γ -secretasa. Localizada en lisosomas y endosomas. | Inicio de deterioro cognitivo similar a las mutaciones de <i>PSEN1</i> con algunos casos de inicio en edades posteriores (60-70 años de edad). Fenotipo similar a la EA esporádica. |
| <i>APP</i> | 21q21.2 | Patogénicas: 6 Probablemente patogénicas: 15 Significado incierto: 34 | Da lugar a una proteína transmembrana (APP) que participa en procesos de sinapsis, precursora del péptido A β y del péptido soluble sAPP α . | Inicio de deterioro cognitivo entre los 50 a los 65 años de edad. Fenotipo similar a la EA esporádica, con algunas mutaciones que causan angiopatías (mutación <i>lowa p.Asp694Asn</i>) o hematomas intracerebrales (portadores de duplicación de la APP). |

2.5.2 Enfermedad de Alzheimer esporádica

Por otra parte, la **EA esporádica** comprende la mayoría de casos (94-99% de éstos), cuyo origen de síntomas se produce entre los 60-65 años aproximadamente y su prevalencia es mayor a medida que se avanza en el rango de edad. El origen de la EA esporádica es insidioso, si bien a lo largo de los años se han descrito que causas ambientales, hábitos alimenticios, comorbilidad con otras enfermedades y la presencia de ciertos polimorfismos en genes concretos (relacionados con el sistema inmune, metabolismo del colesterol o endocitosis y conexiones sinápticas), influyen en la probabilidad de desarrollar esta patología (163). Recientes estudios de asociación del genoma completo (*genome-wide association study* (GWAS)) a gran escala han encontrado hasta 75 *loci* cromosómicos de riesgo para la EA y otras demencias relacionadas, identificando y seleccionando hasta 55 genes de riesgo para la EA (164) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Genes identificados de riesgo de enfermedad de Alzheimer esporádica.

| Gen | Locus cromosómico | Ruta celular | Principales funciones en el organismo y relación con la EA |
|----------|-------------------|--|--|
| CR1 | 1q32.2 | Respuesta inmune | Unión a elementos que desencadenan la respuesta del sistema de complemento. Aclaramiento del péptido A β (165). |
| MS4A | 11q12 | Respuesta inmune | Activación de receptores y canales iónicos y promotores de la respuesta inmune (166, 167). |
| EPHA1 | 7q34-q35 | Respuesta inmune | Receptor con dominio tirosina-quinasa, relacionado con la señalización del factor de necrosis tumoral alfa (<i>tumor necrosis factor Alpha (TNF-α)</i>) (166, 168). |
| CD33 | 19q13.3 | Respuesta inmune Endocitosis | Inhibición de la fagocitosis celular. Control de la activación microglial dependiente de <i>TREM2</i> (169). |
| TREM2 | 6p21.1 | Respuesta inmune | Supresión de la respuesta inflamatoria y la activación microglial (166, 169). |
| CLU | 8p21.1 | Metabolismo lipídico Muerte celular | Proteína chaperona del retículo de Golgi. Inhibición de la muerte celular mediada por apoptosis vía activación de la proteína p53 (165). |
| ABCA7 | 19p13.3 | Metabolismo lipídico Endocitosis | Proteína transportadora que interviene en la liberación de fosfolípidos celulares y colesterol y participa en la formación de las lipoproteínas de alta densidad (<i>high density lipoprotein (HDL)</i>). Participa en la fagocitosis, la cual inhibida por elevados niveles de colesterol intracelular. (167, 169) |
| PICALM | 11q14.2 | Endocitosis | Endocitosis mediada por clatrina. Aclaramiento del péptido A β (170). |
| BIN1 | 2q14.3 | Endocitosis Transmisión sináptica | Participación en el sistema nervioso central en la endocitosis en las vesículas y la transmisión sinápticas (171). |
| CD2AP | 6p12.3 | Endocitosis | Implicada en el tráfico de membrana a través de endocitosis y la remodelación del esqueleto de actina. Interviene en la producción del péptido A β y la hiperfosforilación de Tau (172). |
| INPP5D | 2q37.1 | Respuesta inmune Muerte celular | Hidroliza la unión del fosfatidilinositol trifosfato (PI3P) a la membrana, alterando la unión de proteínas a ésta. Regula negativamente la proliferación y supervivencia de células del sistema inmune (173). |
| CLNK | 4p16.1 | Respuesta inmune | Proteína con función inmunomoduladora que regula la señalización de receptores de células T y B del sistema inmune (174, 175). |
| HLA-DQA1 | 6p21.32 | Respuesta inmune | Pertenece al complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (<i>major histocompatibility complex, class II</i> o <i>MHC class II</i>). Se encuentra en la membrana celular de células presentadoras de antígenos, encargada de presentar péptidos derivados de proteínas exógenas. Se expresa en la microglía (176). |
| UNC5CL | 6p21.1 | Respuesta inmune Muerte celular | Regulador negativo de NF- κ B en respuesta a citoquinas. Su inactivación podría derivar en una mayor muerte neuronal en respuesta a estímulos como la presencia del péptido A β (177). |
| EPDR1 | 7p14.1 | Muerte celular | Glucoproteína de membrana que participa en procesos de adhesión celular, asociada a procesos de apoptosis. (178). |
| APOE | 19q13.32 | Metabolismo lipídico | Apolipoproteína de unión a colesterol y lípidos, presente en los quilomicrones. En el sistema nervioso es producida por microglía y astrocitos y se une a los receptores de APOE presentes en neuronas. Promueve la escisión y aclaramiento del péptido A β en neuronas. Presenta tres isoformas, APOE- ϵ 2 (asociada con mayor riesgo de hiperlipoproteinemia), APOE- ϵ 3 (variante natural y más abundante) y APOE- ϵ 4 (tiene una capacidad reducida para promover la eliminación del péptido A β , además de estar relacionada con otros trastornos como aterosclerosis o enfermedad cardiovascular isquémica). Un 40-65% de pacientes de EA esporádica presentan el alelo APOE- ϵ 4, incrementando el riesgo de EA cuando los dos alelos están presentes (179-181). |
| PTK2B | 8p21.2 | Transmisión sináptica | Proteína citoplasmática que participa en la regulación de canales iónicos y en la regulación de la actividad neuronal. Promueve la pérdida sinapsis debido a deficiencias en las dendritas en un mecanismo activado por la presencia del péptido A β (182). |
| USP6NL | 10p14 | Endocitosis | Promueve la formación de endosomas independientemente de clatrina y el transporte retrógrado desde la membrana plasmática al retículo de Golgi. La asociación de polimorfismos en USP6NL con la EA se da en personas que no portan el alelo APOE- ϵ 4 (183). |
| SPI1 | 11p11.2 | Respuesta inmune | Factor de transcripción que regula la expresión génica en células del sistema inmune (184). |
| EED | 11q14.2 | Expresión génica | Proteína que interviene en la desacetilación de histonas, inhibiendo la expresión de genes entre generaciones. Su actividad es necesaria para la re-mielinización de oligodendrocitos en el sistema nervioso central (185). |
| SORL1 | 11q24.1 | Metabolismo lipídico | Receptor de APOE en la membrana plasmática. Promueve la redistribución de APP al retículo de Golgi, así disminuyendo la producción de A β (186) |

Continuación de Tabla 2.

| | | | |
|---------------------------|---------------------|--|--|
| <i>FERMT2</i> | 14q22.1 | Transmisión sináptica | Regula la actividad de integrinas. Interactúa en el metabolismo de APP, el crecimiento axonal y la plasticidad sináptica (187). |
| <i>SLC24A4</i> | 14q32.12 | Endocitosis | Proteína intercambiadora de sodio/calcio dependiente de potasio, implicada en el desarrollo neuronal (188). |
| <i>SPPL2A</i> | 15q21.2 | Respuesta inmune Endocitosis | Proteína de membrana lisosomal. Cataliza la escisión intramembrana de TNF- α , derivando en la liberación de su dominio intracelular, implicado en la generación del péptido A β (164). |
| <i>MINDY2/ ADAM10</i> | 15q21.3 | Respuesta inmune | Proteína α -secretasa que escinde la proteína APP dentro de la región A β , dando lugar al fragmento secretado sAPP α , el cual tiene un efecto neuroprotector (189). |
| <i>APH1B</i> | 15q22.2 | Ruta de señalización de notch | Proteína transmembrana que forma parte del complejo de la γ -secretasa junto a la presenilina y nicastrina (174). |
| <i>BCKDK</i> | 16p11.2 | Metabolismo de aminoácidos | Proteína reguladora de las rutas de catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (190). |
| <i>IL34</i> | 16q22.1 | Respuesta inmune | Citoquina que promueve la proliferación de células del sistema inmune. Disminuye en macrófagos la expresión de genes involucrados en el reconocimiento y degradación de los péptidos A β (191). |
| <i>PLCG2</i> | 16q23.3 | Respuesta inmune | Cataliza la conversión del fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) a inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol. En la microglía cerebral, interviene en la respuesta inflamatoria mediada por NF- κ B (192). |
| <i>SCIMP</i> | 17p13.2 | Respuesta inmune | Proteína transmembrana involucrada en la señalización intracelular mediada por el complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 en macrófagos (193). |
| <i>WNT3</i> | 17q21.31- q21.32 | Transmisión sináptica Proliferación celular | Proteínas que activan diferentes rutas celulares implicadas en la reorganización del citoesqueleto y la proliferación celular (194). En neuronas, su señalización está implicada en la formación de sinapsis y la plasticidad sináptica (195). <i>WNT3</i> ejerce una actividad neuroprotectora y previene el efecto neurotóxico del péptido AB (196). |
| <i>ABI3</i> | 17q21.32 | Respuesta inmune | Proteína que interviene en la polimerización de la actina. Promueve la migración y actividad fagocítica de la microglía en la eliminación del péptido A β (197). Algunos polimorfismos de <i>ABI3</i> están relacionados con niveles elevados de Tau en el líquido cefalorraquídeo (198). |
| <i>TSPOAP1</i> | 17q22 | Respuesta inmune | Proteína subunidad del complejo receptor de benzodiazepinas en la mitocondria, asociado con la neuroinflamación. Su actividad en el cerebro está relacionada con la síntesis de esteroides y disminución de la acumulación de péptidos A β (199). |
| <i>ACE</i> | 17q23.3 | Respuesta inmune | Proteína que cataliza la conversión de angiotensina 1 en angiotensina 2, con actividad vasopresora. Polimorfismos de ACE relacionados con la acumulación y actividad de la angiotensina 1 en el cerebro promueven mecanismos de neuroinflamación y neurodegeneración aumentando la susceptibilidad neuronal a la presencia del péptido A β (200). La actividad de ACE podría estar relacionada con la degradación directa o indirecta del péptido A β (201). |
| <i>CASS4</i> | 20q13.31 | Transmisión sináptica | Proteína de andamiaje o <i>scaffolding</i> que regula la actividad tirosina-quinasa de la proteína kinasa B (PKB o Akt). Varios polimorfismos de <i>CASS4</i> se encuentran relacionados con un mayor riesgo de desarrollar EA. La actividad de <i>CASS4</i> se encuentra asociada a la función del citoesqueleto, el transporte axonal y la expresión de APP, así como su acumulación en placas neuríticas (202, 203). |
| <i>ADAMTS1</i> | 21q21.3 | Respuesta inmune | Metaloproteínasa con motivos de trombospondina tipo 1 que participa en la remodelación de la matriz extracelular. Su actividad se encuentra relacionada con mecanismos de neuroplasticidad y respuesta inflamatoria, derivando en la degradación del proteoglicano en respuesta a la interleukina 1 (IL1) (204, 205). |

La identificación del papel de estos genes ha permitido avanzar en el conocimiento de los cambios producidos a nivel celular y molecular que derivan en la acumulación del péptido A β y la consiguiente hiperfosforilación de Tau, así como los mecanismos asociados de neurodegeneración de sinapsis neuronales y muerte neuronal selectiva; y la respuesta inflamatoria de la astrogliía y microgliía, eventos que se observan en la progresión de la EA y se detallarán en el siguiente apartado.

2.6 Papel de A β en la patología de la enfermedad de Alzheimer

Como se ha descrito previamente, a nivel celular y molecular, los dos eventos característicos que ocurren en la enfermedad de Alzheimer son la acumulación de depósitos de placas extracelulares del péptido A β y la formación intracelular de ovillos neurofibrilares de la proteína de unión a los microtúbulos tau. Estos eventos son observados a lo largo de toda la patología y años antes del inicio de síntomas cognitivos y cursan con un estado neuroinflamatorio que deriva en la pérdida de sinapsis neuronales en diversas regiones cerebrales encargadas del procesamiento de información o la formación de memorias a largo plazo (206). Hasta el momento, el mecanismo de formación de las placas A β y la formación de ovillos de tau ha sido ampliamente estudiado, si bien aún existen opiniones dispares sobre si estos eventos son causales o consecuencia del verdadero inicio de la EA esporádica.

2.6.1 Metabolismo del péptido A β

La generación del péptido A β se produce a partir del procesamiento secuencial de la proteína APP, el cual genera fragmentos de A β de 37 a 43 aminoácidos (que dan el nombre al fragmento de A β según la secuencia de aminoácidos que la componen), siendo las principales especies tóxicas los fragmentos A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂. La APP es una aspartil-proteasa, una proteína transmembrana de un solo paso (tipo 1) con un dominio extracelular extenso (N-terminal). El *splicing* alternativo de la APP genera hasta 8 isoformas, siendo las más comunes la variante APP₆₉₅, predominante en neuronas, así como las variantes APP₇₅₁ y APP₇₇₀ que se expresan ubicuamente (19). Parte de la secuencia del péptido A β se encuentra en el dominio externo de la proteína APP (dominio N-terminal), mientras que la parte final del péptido se encuentra dentro del dominio transmembrana (dominio C-terminal). A pesar de que la función de la APP aún no ha sido del todo dilucidada, se sabe que puede tener un papel importante en la migración neuronal durante el desarrollo, el crecimiento de neuritas (dendritas y axones), la supervivencia celular o la regeneración de sinapsis (207, 208). Como se ha descrito en la unidad 4, diversas mutaciones que afectan al gen de la APP pueden derivar en una sobreproducción de las formas tóxicas del péptido A β como A β ₁₋₄₂.

En neuronas, la APP recién sintetizada en el aparato de Golgi es transportada directamente por el axón hacia los terminales sinápticos, donde se inserta en la superficie celular. Es allí donde prosigue su procesamiento, el cual puede ser no amiloidogénico (generando fragmentos solubles de APP llamados sAPP α), o amiloidogénico, produciendo fragmentos de péptidos A β , dependiendo del complejo enzimático del que sea sustrato, además de un procesamiento terciario por rutas no canónicas que se produce en menor medida.

2.6.2 Procesamiento por ruta no amiloidogénica: α -secretasa y γ -secretasa

Este tipo de procesamiento es el predominante en condiciones fisiológicas dentro de las dos rutas canónicas descritas. El procesamiento de la APP se produce por la actividad de la proteína α -secretasa, de la familia de desintegrinas y metaloproteasas (*A Disintegrin And Metalloprotease domain* (ADAM)) con más de 30 sustratos conocidos, la cual realiza una escisión dentro de la secuencia del péptido A β , impidiendo su formación. Da lugar a una secuencia peptídica soluble (sAPP α , fragmento N-1, C-16), la cual es liberada al medio extracelular, el cual es ligando del receptor de notch y participa en procesos de supervivencia celular y crecimiento de neuritas (209). Durante la escisión de APP, se queda anclado a la membrana el fragmento restante donde se ha producido el corte en el extremo C-terminal, conocido como C83 o fragmento C-terminal α (CTF α). Este fragmento es posteriormente diana de la actividad de la γ -secretasa, la cual realiza una escisión bien en el aminoácido 40 ó 42, liberando al medio extracelular un péptido soluble llamado p23 (N-17, C-40/42). El fragmento restante conocido como dominio C-terminal intracelular de APP (*APP intracellular C-terminal domain* o AICD), el cual es posteriormente internalizado y dirigido al núcleo celular donde actúa como factor de transcripción (**Figura 1A**).

2.6.3 Procesamiento por ruta amiloidogénica: β -secretasa y γ -secretasa

La vía amiloidogénica del procesamiento de APP se caracteriza por la producción del péptido A β , la cual se incrementa con la edad. En este caso, el proceso se inicia por la actividad del enzima β -secretasa (principalmente por la isoforma BACE1). La β -secretasa es también una aspartil-proteasa, proteína de membrana de un solo paso o tipo 1 que se encuentra activa en el lumen de vesículas y presenta una ruta endocítica. La actividad de la β -secretasa se encuentra relacionada con la mielinización de axones en nervios periféricos durante el desarrollo.

Cuando la β -secretasa entra en contacto con APP, se produce una escisión en el extremo N-terminal en el punto de inicio del péptido A β , liberando al medio extracelular el péptido soluble sAPP β y manteniendo anclado a la membrana el fragmento restante denominado C99 o fragmento C-terminal β (CTF β). Al contrario que el fragmento de la vía no amiloidogénica sAPP α , las funciones del péptido sAPP β son mayormente desconocidas y no parece tener un papel importante la proliferación neuronal (210). Posteriormente, el fragmento C99 es sustrato de la actividad del enzima γ -secretasa, una proteína multimérica formada por 4 subunidades: 1) presenilina (mayormente la isoforma PS1 neuronal por encima de PS2, aspartil-proteasas con actividad catalítica enzimática), 2) nicastrina (sitio de reconocimiento de sustratos), 3) potenciador de presenilina o PS2 (*presenilin enhancer 2*, componente regulador de la actividad de la presenilina), y 4) faringe anterior defectuosa 1 o APH1 (*anterior pharynx-defective 1*), cuya función es la de facilitar la formación del complejo entre presenilina y nicastrina).

La escisión del fragmento C99 por la γ -secretasa en el dominio C-terminal, el cual se produce de forma secuencial en 4 pasos, deriva en la formación del péptido A β , que es liberado al espacio extracelular, y el fragmento AICD. Según el aminoácido donde se produce la escisión, se forman los diferentes tipos de fragmento de A β , predominando los fragmentos A β ₁₋₄₀ (90% del total de fragmentos de A β generados), y A β ₁₋₄₂ (5% del total de fragmentos de A β generados), siendo este último más hidrófobo y con tendencia a formar agregaciones potencialmente neurotóxicas (**Figura 1B**). Debido a que la β -secretasa tiene un punto de actividad óptimo en pH ligeramente ácidos (pH = 5,5-6) y tanto la β -secretasa como la γ -secretasa se localizan en el retículo endoplasmático, aparato de Golgi y endosomas, se ha sugerido que la ruta de procesamiento

amiloidogénica de APP se produce principalmente en endosomas cuya formación está mediada por clatrina en el proceso de endocitosis (211). Debido a que la γ -secretasa presenta una amplia variedad de sustratos, entre los que se encuentra notch, esencial para la neurogénesis y crecimiento de neuritas en la embriogénesis y en la edad adulta, es poco viable su posicionamiento como diana terapéutica a pesar del reciente desarrollo de moduladores de la actividad γ -secretasa (*γ -secretase modulators (GSMs)*) (212).

Descubrimientos recientes apuntan a que la escisión de APP por la β -secretasa es facilitada y precedida por la actividad de un enzima endopeptidasa de asparagina (*asparagine endopeptidase (AEP)*), la cual actúa como una δ -secretasa proamiloidogénica (213). Esta δ -secretasa es liberada al medio extracelular y se asocia con APP, internalizándose en un endosoma, donde se dará lugar al procesamiento de APP. La δ -secretasa escinde a APP en los aminoácidos en posición N-373 y N-585, liberando formas solubles de APP y facilitando la actividad de la β -secretasa al eliminar el impedimento estérico del dominio extracelular de APP para acceder al sitio de corte de $A\beta$ (213). A pesar de que su mecanismo no está ampliamente estudiado, se cree que la δ -secretasa podría estar implicada en la hiperfosforilación de tau en un mecanismo asociado a la proteína fosfatasa 2A (*protein phosphatase 2A (PP2A)*) (214).

2.6.4 Procesamiento alternativo: η -secretasa, α -secretasa, β -secretasa y γ -secretasa

Además de las dos rutas anteriormente descritas, en 2015 se describió una ruta alternativa de procesamiento de APP en condiciones fisiológicas a través de la actividad principal de la η -secretasa, seguida de las α -secretasa, β -secretasa y γ -secretasa (215). Se sabe que esta vía de procesamiento se da en mayor medida cuando la vía de la β -secretasa es inhibida. La η -secretasa, conocida así por escindir la APP en un lugar diferente de las secretasas anteriormente descritas, es una metaloproteínasa de matriz de tipo membrana, la cual escinde la APP en un aminoácido fuera de los sitios de corte de la α -secretasa y la β -secretasa, liberando un péptido soluble $sAPP_{\eta}$ de menor tamaño, quedando anclado a la membrana la mayor parte de la proteína APP restante, el fragmento C-terminal CTF_{η}). Este fragmento es posteriormente escindido por la α -secretasa, liberando el péptido amiloide $A\eta_{\alpha}$, el cual contiene parte de la secuencia del péptido $A\beta$, o bien por la β -secretasa, liberando un péptido de menor tamaño llamado $A\eta_{\beta}$. A pesar de que la función de los péptidos $A\eta$ es hasta el momento desconocida, se sabe que el péptido $A\eta_{\alpha}$ inhibe la potenciación a largo plazo (*long-term potentiation* o LTP) en el hipocampo, mientras que el péptido $A\eta_{\beta}$ es aparentemente inocuo (215).

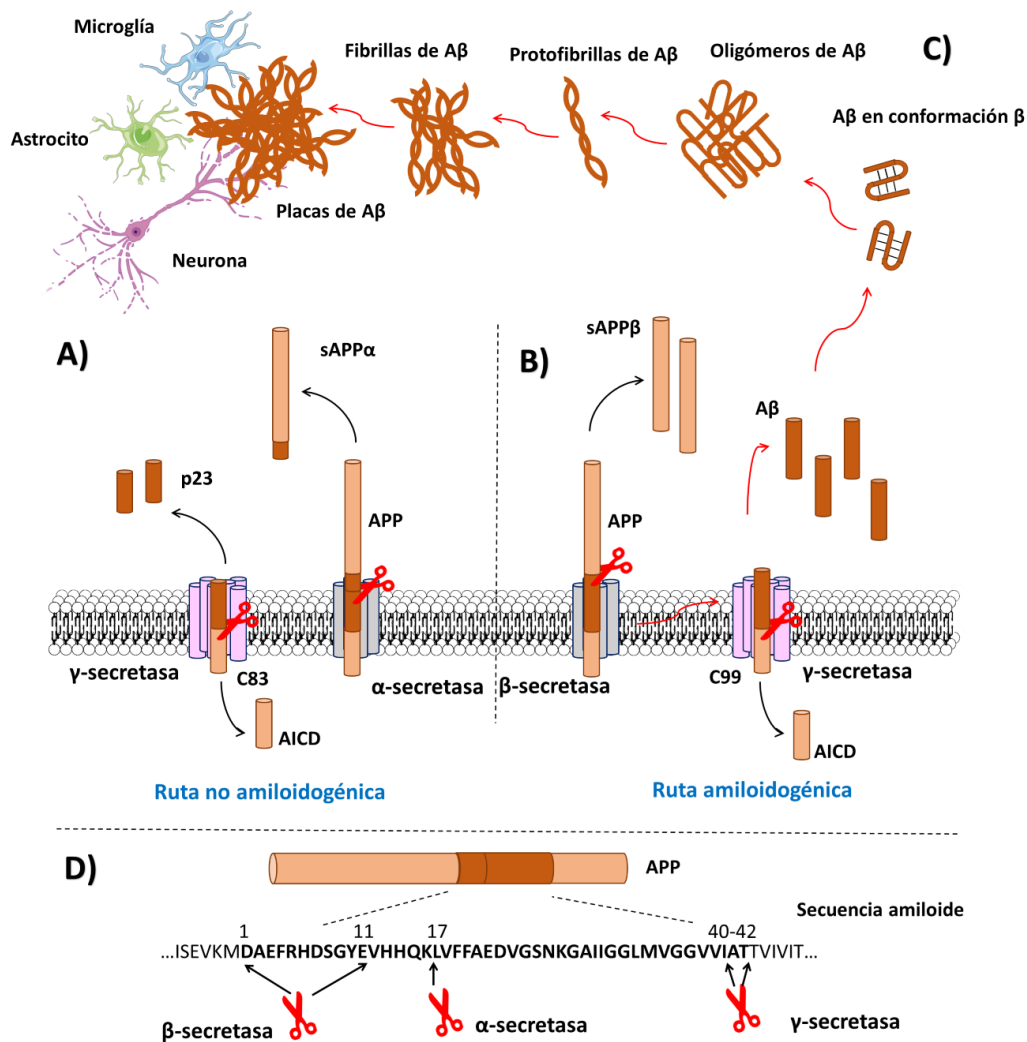


Figura 1. Procesamiento de APP en las principales vías amiloidogénicas y no amiloidogénicas. A) La ruta amiloidogénica comprende la acción secuencial de la α -secretasa, que genera un sAPP α , el cual está involucrado en mecanismos de supervivencia celular y crecimiento de neuritas, dejando anclado a la membrana un fragmento C83, el cual es escindido por la γ -secretasa, generando un fragmento p23 liberado al medio extracelular, y un fragmento AICD que actúa como factor de transcripción. B) Alternativamente, la ruta amiloidogénica comprende primero la escisión de APP por la β -secretasa, generando un sAPP β y dejando anclado a la membrana un fragmento C99, escindido posteriormente por la γ -secretasa, generando un péptido A β_{1-40} ó A β_{1-42} , dependiendo del aminoácido escindido, liberado al medio extracelular, y un fragmento AICD. C) Los péptidos monoméricos de A β , generalmente A β_{1-42} (más insoluble) comienzan a adoptar una conformación de lámina β , la cual deriva en su agregación secuencial formando oligómeros solubles, protofibrillas, fibrillas insolubles y, finalmente, placas neuríticas que alteran la sinapsis neuronal y generan una respuesta inmune derivando en la activación de astrocitos y microglías, implicados en la eliminación de A β . D) Secuencia de aminoácidos donde se produce la escisión de APP a través de las secretasas. APP – proteína precursora amiloide; C83 – fragmento C-terminal α ; C99 – fragmento C-terminal β ; sAPP α – fragmento α soluble de APP; sAPP β – fragmento β soluble de APP.

2.6.5 Polimerización y neurotoxicidad del péptido A β

Como se ha descrito previamente, los péptidos A β pueden ser liberados al medio extracelular por la acción de las secretasas o bien formarse dentro de endolisosomas. En su forma monomérica soluble, el péptido A β es inocuo. La principal diferencia entre las isoformas del péptido A β_{1-40} y A β_{1-42} es la presencia de dos aminoácidos hidrófobos en este último, los cuales le confieren una capacidad de agregación en oligómeros solubles y, posteriormente, en placas insolubles, los cuales tienen un efecto neurotóxico (**Figura 1C, D**).

La agregación de los péptidos A β_{1-42} se da mediante enlaces de lámina- β , de forma secuencial, formando primero dímeros y trímeros, pasando a oligómeros difusibles (*A β -derived diffusible ligands* (ADDLs)), y éstos a protofibrillas y fibrillas. Los estudios indican que la formación de los ADDLs puede estar facilitada por la unión de A β a fosfolípidos peroxidados de membrana como consecuencia del estrés oxidativo producido en la célula y son la forma más tóxica de agregación de A β debido a su capacidad de difundir en las membranas, mientras que las fibrillas insolubles tienen una capacidad neurotóxica menor (216). Hasta el momento se conoce que los ADDLs median en la producción de especies reactivas de oxígeno (*oxygen-reactive species* (ROS)) y nitrógeno (*nitrogen-reactive species* (NOS)), alteran la estabilidad de la membrana plasmática de neuronas y microglía, provocan la interrupción de sinapsis neuronales, procesos autofágicos y disfunción mitocondrial derivando en muerte celular, desencadenan procesos inflamatorios y promueven la hiperfosforilación de Tau (el otro gran factor molecular indicativo de la EA) (1, 20).

En una compactación más compleja que los oligómeros, las fibrillas de A β insolubles se agregan en el parénquima y comienzan a formar depósitos extracelulares, placas seniles o amiloides, las cuales son fácilmente distinguibles mediante técnicas de inmunohistoquímica. Las placas amiloides en general se clasifican en “difusas” y “densas” o “neuríticas”, las cuales presentan propiedades muy diferentes. Las placas difusas no tienen una estructura fibrilar y son las primeras placas distinguibles que aparecen en el tiempo, siendo comunes en el cerebro de personas de avanzada edad sin deterioro cognitivo aparente (217). Se cree que a partir de estas placas difusas se forman las placas neuríticas, con fibrillas empaquetadas de forma mucho más densa y rodeadas de neuritas (evento que le da el nombre de “placas neuríticas”), microglía activada y astrocitos reactivos. Uno de los mecanismos descritos para la formación de placas densas es la internalización del péptido A β mediante procesos de endo- y fagocitosis, donde se generan las fibrillas que terminan formando placas amiloides que derivan en la muerte celular y su liberación al medio extracelular (218). La aparición de estas placas neuríticas se produce años antes del inicio de los síntomas de deterioro cognitivo y se puede observar mediante tinción amiloide (con los colorantes Rojo Congo y tioflavinas). Las neuritas distróficas que rodean a las placas densas tienen un gran contenido mitocondrial y cuerpos densos de origen lisosomal, los cuales se forman debido a la presencia de A β , así como estructuras filamentosas de tau hiperfosforilada, la cual desestabiliza la estructura microtubular de las neuronas y provoca la detención del transporte axonal y una sinapsis disfuncional debido a la acumulación de vesículas de neurotransmisores debido a un transporte deficiente de éstas desde el soma (21-23).

Además de acumularse en el parénquima, las placas amiloides se pueden depositar rodeando la túnica media de vasos sanguíneos y arterias leptomeningiales, debido a un mecanismo alterado de eliminación, el cual causa una angiopatía amiloide cerebral (*cerebral amyloid angiopathy* (CAA)), presente en hasta un 80% de pacientes con EA y visible mediante tinción amiloide, que puede provocar, en casos más graves, hemorragias cerebrales. A diferencia de las placas amiloides que se forman en el parénquima, estas están compuestas mayormente del péptido A β_{1-40} , el cual presenta mayor solubilidad (219).

2.6.6 Eliminación de A β

El cerebro cuenta con varios mecanismos para eliminar la deposición de A β . La microglía es capaz de reconocer el péptido A β en placas amiloides a través de su unión a los receptores de membrana como los receptores *scavenger* (*scavenger receptor* (SR)), receptores de péptidos de formilo (*formyl peptide receptor* (FPR)) CD36, CD47 o las integrinas, las cuales median un mecanismo de fagocitosis del péptido amiloide (220-224). Una vez internalizado, se produce la degradación del péptido A β a través de la actividad de diversas enzimas proteasas, como la neprilisina, catepsinas, metaloproteasas, activadores de plasminógenos, la ACE, la enzima convertidora de endotelina (*endothelin-converting enzyme* (ECE)) o la enzima degradadora de insulina (*insulin-degrading enzyme* (IDE)) (24-28). Si bien la microglía es la principal encargada de las reacciones de fagocitosis de A β , se sabe que los astrocitos y macrófagos también participan en la internalización y degradación intracelular de A β (35, 36). Por otra parte, la unión de A β a receptores de tipo *toll* (*toll-like receptor* (TLR)) en microglía y astrocitos desencadena una respuesta inflamatoria con la secreción de citoquinas, las cuales reducen la capacidad de eliminar AB a través de mecanismos de fagocitosis y degradación intracelular (29). Por lo tanto, en estadios más avanzados de la EA, una respuesta neuroinflamatoria exacerbada índice negativamente sobre la capacidad del organismo de eliminar la acumulación de A β .

Otro de los mecanismos esenciales para la eliminación de A β ocurre a través de la barrera hematoencefálica, pasando al sistema vascular, y a través del sistema linfático. Este evento ocurre mayormente por la unión de APOE al complejo de A β . APOE es producido mayormente por astrocitos y, en menor medida por microglía y neuronas en respuesta a estímulos de los astrocitos (30). Si bien APOE promueve la escisión de A β intracelular, el complejo de APOE y A β puede unirse a la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1)), así como al receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (*very low density lipoprotein receptor* (VLDLR)) en los propios astrocitos que rodean el endotelio vascular del cerebro, facilitando su trasvase a través de la barrera hematoencefálica (31, 32). Además, la eliminación del péptido A β en su forma monomérica soluble puede producirse por su unión directa a LRP1 (33). APOE actúa en conjunto a otras proteínas como la glucoproteína-P o glucoproteína de permeabilidad (*permeability glycoprotein* (Pgp)) de forma que LRP1 capta el A β del fluido intersticial y Pgp, la cual se localiza en la cara luminal de las células del endotelio vascular, promueve su liberación a la sangre (225). Una vez en el sistema vascular, se ha observado mediante el marcaje radiactivo de A β con yodo radiactivo que la acumulación de A β se produce en órganos como el hígado, riñones o el tracto gastrointestinal, donde sufre un proceso catabólico que deriva en su eliminación sistémica (73).

2.7 Papel de tau en la patología de la enfermedad de Alzheimer

Las patologías neurodegenerativas que comparten la presencia de inclusiones intracelulares de la proteína tau en un estado aberrante formando ovillos neurofibrilares o gliofibrilares son denominadas como tauopatías. Además del Alzheimer, otras tauopatías son la encefalopatía traumática crónica, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal, la demencia frontotemporal, la tauopatía primaria relacionada con la edad, la panencefalitis esclerosante subaguda, el parkinsonismo postencefalítico, la encefalopatía por plomo o la esclerosis tuberosa (226). Todas ellas comparten un aspecto neuropatológico y es que presentan degeneración lobar frontotemporal.

El gen de la proteína tau asociada a microtúbulo (*microtubule-associated protein tau (MAPT)*), se localiza en el locus cromosómico 17q21.1, y da lugar a una proteína tau que sufre una serie de modificaciones post-traduccionales, entre las que se encuentran la O-glucosilación y la acetilación de residuos. Tau es una proteína de unión a microtúbulos, localizada principalmente en los axones de neuronas y en menor medida en las dendritas de éstas. Existen seis isoformas de tau en el sistema nervioso central generadas por *splicing* alternativo, distinguidas por el número de dominios de unión a microtúbulos, bien sean tres (denominadas 3R) o cuatro (4R). Se ha descrito que Tau posee 85 residuos de serina y treonina con capacidad de ser fosforilados, de los cuales se han reportado fosforilaciones en 45 de ellos (227). Debido al gran número de residuos fosforilables, tau es un buen sustrato para las proteínas quinasas (228). La mayoría de las quinasas relacionadas con la fosforilación de Tau forman parte de la familia de las proteínas quinasas de serina/treonina, que incluyen: la proteína quinasa activada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase (MAPK)*), la glucógeno sintasa-quinasa 3 β (*glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β)*), la proteína quinasa activada por 5' AMP (*5' AMP-activated protein kinase (AMPK)*), la quinasa dependiente de ciclina 5 (*cyclin-dependent kinase 5 (CDK5)*) o la proteína quinasa A (*protein kinase A (PKA)*) (229-234). Además, es sustrato de otras fosfatasa, estableciendo un equilibrio fisiológico en el estado de fosforilación/desfosforilación. En situaciones normales, tau desfosforilada se asocia a microtúbulos en los terminales axónicos, favoreciendo la agregación de la tubulina y su polimerización. La actividad de tau permite el transporte axonal mediado por kinesina y dineína y la liberación de vesículas sinápticas. La fosforilación de tau promueve su liberación de microtúbulos y permite a tau reorganizar la estructura tubular en la célula.

En la EA se produce un proceso de hiperfosforilación de tau, en el cual ésta pierde su capacidad de unión al microtúbulo y la desestabilización del citoesqueleto, derivando en una disfunción de la estructura y transporte axonal, la acumulación de vesículas, daño mitocondrial y la aparición de neuritas distróficas como se vio en la sección anterior (235). Este proceso se ve mediado por la agregación de las especies de tau hiperfosforilada, la cual es soluble, formando filamentos helicoidales emparejados (*paired helical filaments (PHF)*) insolubles que acaban formando ovillos neurofibrilares (*neurofibrillary tangles (NFT)*) con una gran capacidad citotóxica. Además de estas formas, tau puede encontrarse hiperfosforilada y conformando oligómeros que son liberados a la matriz extracelular (227).

Uno de los motivos que “disparan” la hiperfosforilación de tau es la presencia del péptido A β , el cual promueve la actividad de la GSK-3 β (236) y genera un incremento de los niveles de calcio intracelulares en neuronas, resultado en la activación de calpaína y, por consiguiente, de la CDK5 (CDK5 permanece activa y unida a p35, mientras que el incremento de calcio promueve la escisión a través de la calpaína de p35 en p25, fragmento que queda asociado a CDK5, y p10, derivando en un estado hiperactivo de CDK5) (237-239). Además, tau es sujeto de escisión proteolítica por la actividad de la caspasa 3 inducida por GSK-3 β , la cual genera fragmentos de tau que tienden a ser hiperfosforilados y que podrían servir de “nido” para la agregación de especies de tau hiperfosforiladas de longitud completa (240, 241). Además, se ha descrito que tau hiperfosforilada secuestra y promueve la hiperfosforilación de otras formas de tau no patológicas (242). Tau hiperfosforilada puede ser liberada mediante exocitosis, y ser internalizada por otras células en forma de agregados neurofibrilares, promoviendo la hiperfosforilación de tau en un mecanismo de propagación de tipo priónico célula a célula, afectando a las regiones cerebrales interconectadas sinápticamente. (243). La propagación de tau es específica y secuencial, de forma que primero afecta a zonas de la corteza entorrinal, extendiéndose posteriormente hacia el sistema límbico y el hipocampo, generando deterioro cognitivo leve, y terminando por invadir la corteza cerebral (244).

2.8 Hipótesis de la cascada amiloide como causa de la enfermedad de Alzheimer

Generalmente, la hipótesis más aceptada como causa plausible de la EA es la surgida de la cascada amiloide, la cual se ha sustentado durante más de dos décadas (34). En este supuesto, la producción del péptido A β es el eje central que conlleva al deterioro cognitivo, el cual se va acumulando con la edad (siendo éste el principal factor de riesgo para la EA), debido a un aumento de su producción y una reducción en los mecanismos de eliminación (34). Como se ha discutido previamente, la formación de oligómeros solubles de A β tiene un efecto neurotóxico, que puede provocar la disfunción neuronal, con una consiguiente activación de ciertas proteínas kinasas como GSK-3 β y CDK5, derivando en la hiperfosforilación de tau y una alteración del citoesqueleto. En última instancia, la formación de NFTs de tau provoca neurodistrofia, la cual se observa alrededor de las placas neuríticas, acompañada de una reacción neuroinflamatoria en la que se observa la presencia de microglía activada y astrocitos reactivos. El desarrollo de la patología amiloide es, por lo tanto, anterior a la formación de NFTs, de forma que se empieza a observar en la corteza parietal-temporal-occipital, extendiéndose posteriormente hacia la corteza temporal, mientras que la patología de tau se origina de forma más tardía, en la corteza entorrinal y luego englobando el sistema límbico (**Figura 2**).

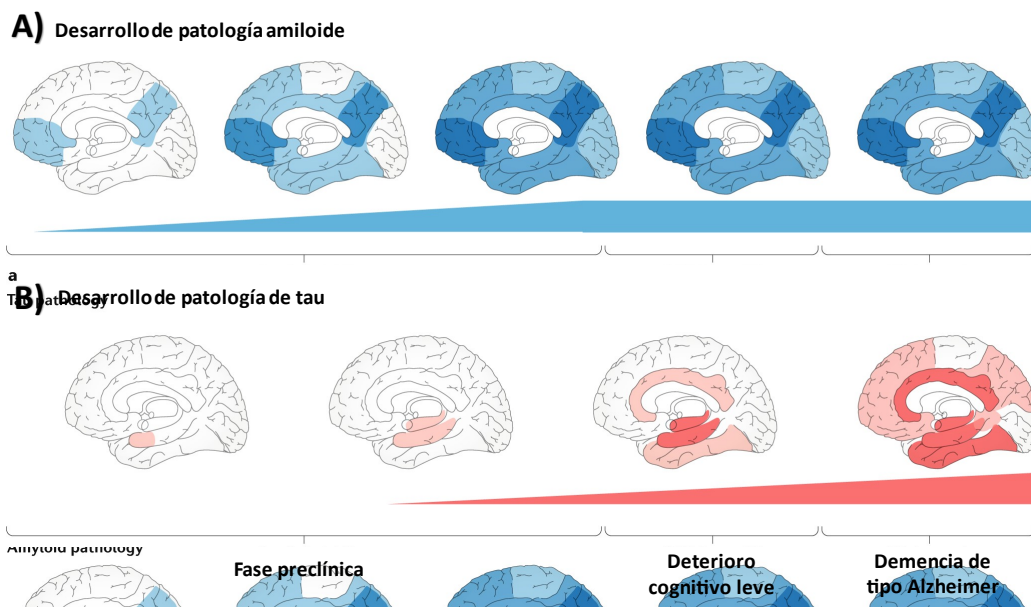


Figura 2. Patrón de desarrollo de la patología amiloide y la patología de tau. A) Aparición secuencial de la patología amiloide, que se desarrolla primero en las regiones parietal-temporal-occipital, extendiéndose hacia la corteza temporal (hipocampo, parahipocampo, amígdala) en un estadio prodrómico de la enfermedad de Alzheimer, y posteriormente en toda la extensión cortical. B) Desarrollo de la patología de tau, que primero se observa en la corteza entorrinal, extendiéndose posteriormente hacia el sistema límbico y el hipocampo, generando deterioro cognitivo leve, y terminando por invadir la corteza cerebral. Adaptado de Van der Kant et al., 2020 (245).

No obstante, esta hipótesis no se encuentra exenta de controversia. Uno de los principales sustentos de la cascada amiloide es la presencia de mutaciones que afecta al procesamiento amiloidogénico de APP, que son suficientes para provocar la EA esporádica. Se ha observado a través de estudios de PET amiloide que la acumulación de depósitos de A β ocurre precede el

deterioro cognitivo e incrementa gradualmente, pero no es consistente ni guarda correlación significativa con el grado de deterioro cognitivo (246, 247). Una de las corrientes más recientes de esta teoría sugiere que son las formas solubles de A β , las que promueven el deterioro cognitivo a través de la formación de NFTs de tau. En un estudio *in vivo* en modelos animales que portan mutaciones para sobre expresar APP y/o PS1, el *knockout* para tau reduce considerablemente la muerte neuronal, la pérdida de sinapsis y defectos cognitivos y motores (248). Sin embargo, en un estudio en pacientes de edad avanzada sin deterioro cognitivo aparente se ha observado que, a pesar de que los niveles en el líquido cefalorraquídeo de tau y tau fosforilada se correlacionan con los niveles de A β 1-42, éstos no se encuentran significativamente asociados al desempeño en los test cognitivos (249). Además, el gen *MAPT* no encuentra entre aquellos genes de riesgo de Alzheimer, ni se han determinado mutaciones potenciales causantes de la EA, en tanto que se han descrito hasta 50 mutaciones de tau que desencadenan en otras taupatías como se recoge en la revisión de Ghetti et. Al (2015) (250).

2.9 El estrés oxidativo y la neuroinflamación como potenciales mecanismos desencadenantes de la enfermedad de Alzheimer

El hecho de que la hipótesis de la cascada amiloide, la más aceptada por la comunidad científica, tenga ciertas lagunas a la hora de explicar la causalidad de la EA, ha derivado en la formulación en paralelo de otras hipótesis sobre el posible origen de ésta. Una de las hipótesis plantea que el estrés oxidativo y la neuroinflamación, los cuales son eventos que se producen por la acumulación de A β y NFTs de tau, podrían no ser sólo meros actores secundarios como respuesta a la patología, sino una de las principales causas de ésta (251). Uno de los puntos que sustentan esta propuesta es la presencia de mutaciones que aumentan el riesgo de padecer Alzheimer en genes relacionados con el sistema inmune, abarcando las funciones que la microglía y los astrocitos realizan en el cerebro, como los mecanismos de fagocitosis y autofagia (*CD33*, *TREM2*, *PICALM*, *BIN1*, *CD2AP*, *US6PNL*, *SCL24A4* y *SPPL2A*), presentación de antígenos (*HLA-DQA1* y *SCIMP*) o respuesta y secreción de citoquinas (*IL34*, *UNC5CL*, *SPPL2A* y *ADAMTS1*) como se ha descrito en la Tabla 1.

Se sabe que la microglía se encuentra activada en respuesta a la unión de A β a sus receptores, lo cual desencadena una respuesta fagocítica para intentar eliminar fibras de A β (252). Sin embargo, se ha observado en estudios en un modelo murino de sobreexpresión de APP y PS1, que la activación de la microglía ocurre de forma previa a la acumulación de placas neuríticas y que, de hecho, la microgliosis podría contribuir a la formación de éstas (253, 254). De igual manera que la microglía, también se han observado en modelos animales de EA la aparición de astrocitos reactivos (255). La reactividad temprana de los astrocitos puede ser una de las causas que provoquen la disfunción sináptica, así como la capacidad de eliminar A β mediante APOE (35, 36). Además, la producción de citoquinas como IL-1 β ó TNF- α son factores que promueven la producción de A β , derivando en un mecanismo de retroalimentación positiva donde se produce una sobreactivación de la respuesta de la microglía y astrocitos en el cerebro (29). Aún se desconocen cuáles podrían ser las causas de la respuesta de microglía y astrocitos previa a la formación de placas de A β , no obstante, no se puede descartar la influencia de formas solubles u oligómeros de A β como las posibles causas de la neuroinflamación. Otra de las posibles causas es la exposición a estímulos pro-inflamatorios como citoquinas del sistema periférico, las cuales desencadenan una hiperreactividad de la microglía, de modo que un estado inflamatorio

continuo en el organismo podría contribuir a una respuesta neuroinflamatoria y a la eliminación defectuosa del péptido A β . Este estado inflamatorio sistémico puede deberse a causas como la resistencia a insulina periférica, la cual genera una respuesta inflamatoria que altera la dinámica de autofagia en el cerebro y promueve la producción de ROS que alteran la integridad sináptica (37-40). Por otra parte, la actividad neuronal está estrechamente vinculada a la regulación local del flujo sanguíneo cerebral (*cerebral blood Flow (CBF)*) a través de una compleja comunicación celular de las células neurales y vasculares denominada acoplamiento neurovascular (*neurovascular coupling (NVC)*), por lo que los problemas cardiovasculares también pueden ser un componente mayor en la respuesta inflamatoria en la enfermedad de Alzheimer (256, 257).

Si bien estos factores podrían contribuir significativamente al desarrollo de la EA, observándose un patrón de neuroinflamación temprano antes de la aparición de síntomas cognitivos, los datos que poseemos hasta ahora no indican que la neuroinflamación *per se* sea la causa de la aparición de la EA, sino más bien parecen apoyar la idea de que la respuesta de microglía y astrocitos es un factor más que contribuye con gran peso en el desarrollo de la EA.

2.10 La señalización de insulina en el cerebro

La insulina es una hormona de 51 aminoácidos secretada por las células β pancreáticas, cuya función principal es la de facilitar el transporte de glucosa hacia las células a través de los transportadores de glucosa (*glucose transporter (GLUT)*) y regular la homeostasis energética, favoreciendo su almacenamiento promoviendo la glucogenogénesis, así como la formación de triglicéridos (*triacylglycerol (TAG)*), entre otros mecanismos. La importancia de la insulina en las funciones cerebrales ha sido ampliamente revisada en los trabajos de Arnold et, al (2018) (258). y De Felice et. al (2022) (259). En el cerebro se ha observado expresión local del gen de la insulina y tanto neuronas como células gliales expresan el receptor de insulina (*insulin receptor* o IR), siendo un factor importante para mantener la actividad cerebral, facilitando el uso de glucosa como fuente de energía y actuando como factor trófico, estimulando la plasticidad sináptica y la proliferación celular (41-45). Estudios recientes han mostrado que el receptor de insulina tiene una función importante en el hipocampo, ya que regula la transmisión sináptica y promueve la potenciación a largo plazo de las transmisiones glutamatérgicas al estimular la traslocación a la superficie celular y la fosforilación de los receptores de N-metil-d-aspartato (*N-methyl-d-aspartate (NMDA)*) y ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)*) (260-262). Por otra parte, los niveles periféricos de insulina son detectados con precisión por el hipotálamo, una región cerebral encargada de controlar los procesos de ingesta, gasto energético, respuesta endocrina y nerviosa para mantener la homeostasis de la energía en el organismo. La importancia de la insulina en esta región se encuentra más ampliamente descrita en el **apartado 2.14**.

2.11 Mecanismo de señalización de la insulina

Para comprender las respuestas celulares a la insulina, es esencial conocer su mecanismo de señalización intracelular, donde se han descrito un mecanismo clásico o canónico y una vía alternativa o no canónica de la acción de la insulina, descritas en el trabajo de López-Gambero et. al (2020) (263).

2.11.1 Vía canónica de la señalización de insulina

El mecanismo de acción clásico de la señalización de la insulina ha sido ampliamente descrito y revisado (264-266) (**Figura 3**). Brevemente, la unión de la insulina a su receptor (IR) en los tejidos diana, promueve la autofosforilación del primer residuo Tyr146 y posteriormente, los residuos Tyr105 y Tyr151. Este grupo de tirosina fosforilada recluta sustratos del IR como las proteínas sustrato del receptor de insulina (*insulin receptor substrate* (IRS)) (IRS1 e IRS2 como las mejor descritas, incluyendo también IRS3 e IRS4) y las proteínas Shc, que son entonces también fosforiladas. La Shc activa la vía Ras/MAPK/ERK, que incluye la unión del complejo SOS/Grb2 a la Shc fosforilada, la conversión de Ras-GDP unido a la membrana en Ras-GTP y la activación consecutiva de Raf, MEK (vía fosforilación) y ERK (vía fosforilación). Esta vía explica principalmente los efectos promotores del crecimiento de la insulina como factor trófico. Por otro lado, los IRS1 y 2 continúan la vía PI3K/Akt/mTOR. El dominio regulador p85 del fosfatidilinositol 3 quinasa (*phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)) es reclutado por los residuos fosforilados de las proteínas IRS y conduce a la fosforilación del fosfatidilinositol (4,5)-difosfato (*phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate* (PIP2)) en fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (*phosphatidylinositol (3,4,5)-biphosphate* (PIP3)). La proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositida (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1* (PDK1)) es atraída y activada por el aumento de los niveles de PIP3, lo que conduce a la activación de la fosforilación de Akt (también conocida como PKB). La activación completa de Akt parece necesitar una fosforilación complementaria por parte del complejo 2 de la diana de la rapamicina de los mamíferos (*mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2)). A continuación, Akt media la mayor parte de los efectos de la insulina, ya que fosforila e inhibe la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), impidiendo la inhibición de la glucógeno sintasa (*glycogen synthase* (GS)) y provocando un aumento de la síntesis de glucógeno. Akt también promueve la captación de glucosa mediante la movilización del transportador de glucosa 4 (*glucosa transporter 4* (GLUT4)) desde las gotas internas a la membrana plasmática y activa el complejo mTOR 1 (mTORC1) mediante la inhibición de la esclerosis tuberosa 1 (*tuberal sclerosis 1* (TSC1), también conocida como hamartina) y 2 (TSC2, también conocida como tuberina), lo que conduce a la síntesis de proteínas y lípidos. La señalización de la insulina es un proceso más complejo que implica a proteínas importantes que participan en la vía glucogénica como la fructosa 2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2) o en la vía lipogénica como la lipasa sensible a las hormonas (HSL), que están reguladas negativamente por la PKA, también inactivada por Akt.

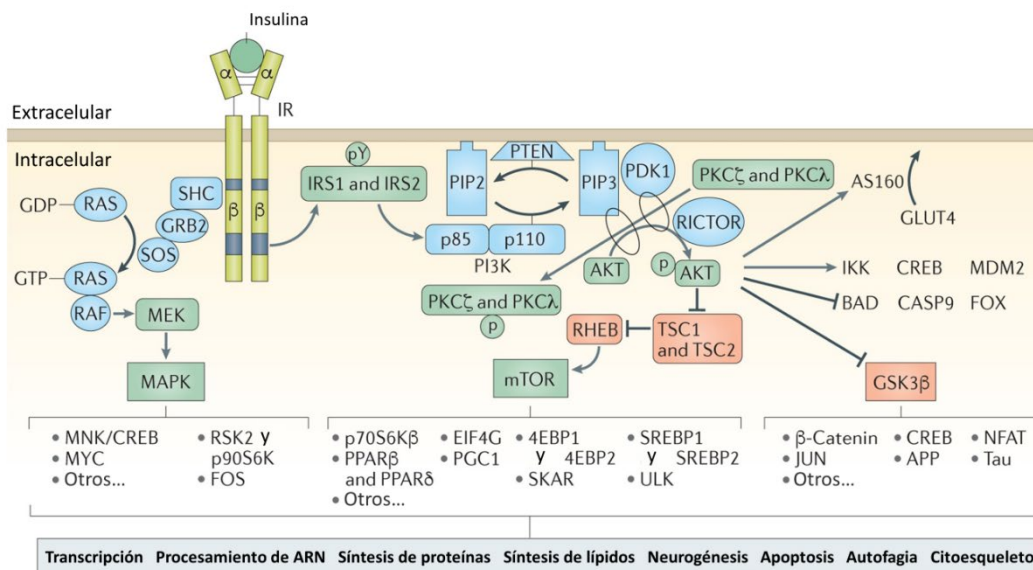


Figura 3. Ruta de señalización de insulina por la vía canónica y principales procesos intracelulares involucrados. 4EBP - proteína de unión al factor 4E de iniciación de la traducción eucariota; APP - proteína precursora de amiloide; EIF4G - factor de iniciación de la traducción eucariota 4y; FOS - protooncogén c-Fos; GRB2 - proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento; JUN - factor de transcripción AP-1; MEK - MAPK/ERK quinasa (también conocida como MAPKK); MNK - quinasa que interactúa con la señal de MAP quinasa (también conocida como MKNK); NFAT - factor nuclear de células T activadas; p70S6Kβ - p70 quinasa S6 ribosomal β (también conocida como S6Kβ2); p90S6K - proteína ribosomal S6 quinasa 1 de 90 kDa (también conocida como S6Kα1); PDK1 - proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositida; PGC1 - coactivador 1 de PPARy; PIP2 - fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato; PIP3 - fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato; PPAR - receptor activado por proliferador de peroxisomas; RÍCTOR - compañero insensible a la rapamicina de mTOR; SHC - proteína transformadora de Shc; SKAR - S6K1 objetivo similar a Aly/REF (también conocido como POLDIP3); SOS – son of sevenless; SREBP – proteína de unión a elementos reguladores de esteroides; TSC1 - hamartina; TSC2 - tuberina. Adaptado de Arnold et al., 2018 (258).

2.11.2 Vía no canónica de la señalización de insulina

La vía canónica previamente descrita, sugiere un papel importante del D-chiro-inositol (DCI) y los inositoles fosfoglicanos (*inositol phosphoglycan* (IPG)) en la señalización de la insulina. La insulina se encuentra asociado a caveolinas y es capaz de activar a proteínas fosfolipasas, como la fosfolipasa C (*phospholipase C* (PLC)) o D (PLD), los cuales liberan el anclaje de proteínas unidas a la membrana mediante IPGs, y facilita la actividad de la proteína quinasa pp59^{lyn}, previamente unida a la caveolina, mediando la fosforilación de IRS1 o IRS2.

2.12 Evidencias de resistencia a la insulina en la enfermedad de Alzheimer

Desde hace tiempo se ha mostrado que la progresión de la EA se encuentra asociada a la disregulación de la señalización de insulina en aquellas regiones asociadas con la patología cognitiva, como el sistema límbico y el hipocampo. Se ha observado un descenso de la expresión del gen de la insulina en un patrón similar al aumento de la expresión de APP y los marcadores de activación glial GFAP (*glial fibrillary activation protein*) y astrocítica IBA1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*) (46). En otro análisis *post-mortem* de hipocampo en humanos se ha

encontrado una correlación entre niveles elevados de fosforilación en residuos de serina (inhibitoria) de IRS1 con niveles de A β oligomérica, los cuales a su vez se asociaban negativamente al desempeño en tareas de memoria de trabajo y memoria episódica (47). La disminución en la señalización de insulina en el cerebro está relacionada con el hipometabolismo energético como consecuencia de un menor uso de glucosa como fuente de energía en pacientes de Alzheimer (267). Además, se ha que la hiperactivación de mTOR, diana de la insulina, ocurre en estadios tempranos de la enfermedad en pacientes de AD (268). La desregulación de mTOR deriva en defectos en el mecanismo de autofagia celular y la homeostasis de energía en la célula (269, 270).

Uno de los mecanismos asociados a la disfunción de la señalización de insulina en el cerebro es la susceptibilidad del alelo APOE- ϵ 4, el cual se ha visto en modelos animales que interactúa con el IR y promueve su secuestro en endosomas, impidiendo el tráfico de IR hacia la membrana celular y disminuyendo la señalización de insulina (48). Estos estudios concuerdan con el hipometabolismo cerebral mostrado en pacientes portadores del alelo APOE- ϵ 4 (49). Otro de los posibles factores que contribuyen a la disminución de la señalización de insulina es la neuroinflamación sostenida en el cerebro de pacientes con EA. Se ha mostrado que la citoquina inflamatoria TNF- α inhibe la señalización de insulina a través de la desregulación de IRS1 en células gliales del hipocampo (271).

Además de su papel trófico, existen evidencias de que la señalización de insulina interviene directamente en los mecanismos patológicos de A β y tau. Se ha mostrado en estudios *in vitro* que la insulina es capaz de inhibir la unión de oligómeros de A β a los terminales axónicos y reducir el daño que éstos causan a la sinapsis neuronal (272). Además, se ha observado en un estudio realizado en perros *Beagle* (modelo de EA) que la señalización de insulina, a través de la proteína biliverdina reductasa A (*biliverdin reductase A* (BVR-A)) previene la internalización de la β -secretasa en endosomas, disminuyendo la vía amiloidogénica de procesamiento de APP y la generación de A β (50).

La señalización de insulina también se ha asociado en varias ocasiones a la regulación de la actividad de tau. La resistencia a insulina cerebral provoca un aumento de la actividad de la proteína quinasa GSK-3 β , la cual es un elemento secundario de la ruta de insulina y promueve la hiperfosforilación de tau (51). Tau, a su vez, interactúa con la proteína homóloga de fosfatasa y tensina (*phosphatase and tensin homolog protein* (PTEN)), la cual incrementa la fosforilación inhibitoria en residuos de serina de IRS1 y disminuye la señalización de insulina en un mecanismo de retroalimentación positivo (52). La hiperfosforilación de tau a través de la resistencia de insulina también se ha relacionado con los segundos mensajeros Akt y ERK (273). También se ha observado en un modelo animal de sobre-expresión de tau que la disminución de la señalización de insulina también está relacionada con la inhibición de la proteína fosfatasa 2A (*protein phosphatase 2A* (PP2A)), una de las mayores fosfatasas que intervienen en la desfosforilación de tau (274). Estos mecanismos demuestran una asociación clara entre la señalización de insulina en el cerebro y los cambios progresivos observados a nivel celular y molecular en el Alzheimer.

2.13 Estado actual de la terapia farmacológica en la enfermedad de Alzheimer

En el año 2022, hay actualmente respaldados hasta 442 ensayos clínicos sobre la EA y otras demencias relacionadas, según el *National Institute on Aging* (NIA) (53). La mitad de ellos (212 ensayos) son tratamientos no farmacológicos orientados hacia el cuidado y bienestar de los pacientes con demencia de tipo Alzheimer, incluyendo el desarrollo de tecnologías para la asistencia y monitorización de pacientes o el bienestar de éstos. Sin embargo, sólo 65 ensayos clínicos profesan en torno a aproximaciones farmacológicas, de los cuales sólo 8 se encuentran en la fase clínica III (más próxima a alcanzar la validación como tratamiento por las distintas agencias reguladoras de medicamentos y fármacos del mundo). De estas intervenciones farmacológicas, las más abundantes son aquellas que tienen como diana al péptido A β (mayormente anticuerpos que pretenden unirse y evitar la agregación de A β y sus efectos neurotóxicos) o compuestos que modulan la respuesta inflamatoria (**Figura 4**). Esto es debido a que, en los últimos años, la mayoría de las aproximaciones farmacológicas orientadas al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer se han basado en la hipótesis de la cascada amiloide. No obstante, existe una disparidad entre la aparición de los primeros rasgos de patología amiloide y la posible correlación con el deterioro cognitivo progresivo en los pacientes de Alzheimer. Las actuales propuestas farmacológicas se enfrentan a diversos ratos que retrasan la aparición de una terapia efectiva, como son: la seguridad sobre efectos secundarios de la administración del fármaco, su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, la poca traslación entre los resultados en modelos animales de la patología amiloide con respecto a los ensayos en humanos, y la correcta elección del tiempo de administración del fármaco, puesto que muchos de los ensayos clínicos hasta la fecha se han basado en sujetos que ya mostraban signos de deterioro cognitivo, disminuyendo la eficacia real del fármaco.

Por ello, cada vez se hace más necesario un cambio de enfoque o paradigma orientado hacia la prevención o el freno del posible avance de la enfermedad. Para ello, es necesario la búsqueda de indicadores de salud y biomarcadores cuantificables y eficaces que permitan iniciar un tratamiento temprano. En los últimos años se han ido recopilando evidencias que relacionan los trastornos de la ingesta de alimentos y el metabolismo periférico, como los cambios en el peso corporal, alteraciones del sistema endocrino y los procesos de homeostasis energética pueden ser indicativos tempranos, no sólo de Alzheimer, sino que se correlacionan con la agresividad posterior con la que se desarrollarán los síntomas cognitivos de la EA. Una de las posibles causas es la relación de estos procesos con la producción de especies reactivas y estrés oxidativo, neuroinflamación y, en término final, la neurodegeneración. con procesos que inducen neuroinflamación y neurodegeneración en la EA. Por tanto, es importante determinar cuáles son los cambios que se producen a nivel metabólico en el organismo, relacionados con el proceso de la EA, en un contexto en el que varios eventos tempranos podrían estar interrelacionados entre sí, indicando el progreso de la enfermedad. Esto permitiría abrir nuevas vías de tratamiento, basadas en alternativas farmacológicas que puedan suministrarse de forma segura siglos antes de la posible aparición de síntomas cognitivos. En la actualidad hay 10 ensayos clínicos en marcha basados en intervenciones de la dieta o la suplementación con agentes naturales, con una expectativa de crecimiento en los años posteriores (**Figura 4**).

Ensayos clínicos en activo de Alzheimer y demencia de tipo Alzheimer de la NIA

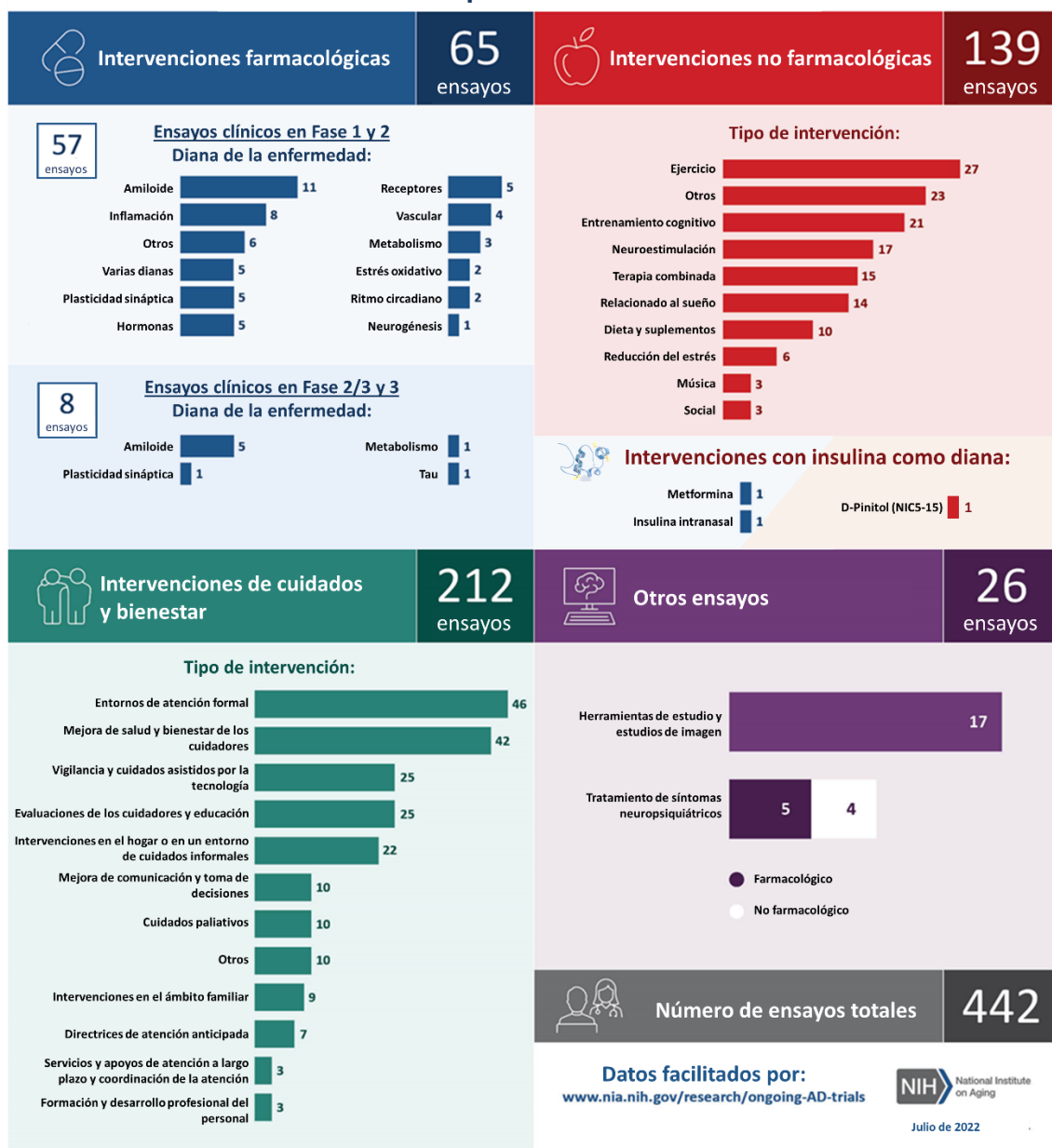


Figura 4. Actuales ensayos clínicos con relación al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En azul, intervenciones farmacológicas. En rojo, intervenciones no farmacológicas. En verde, intervenciones basadas en el cuidado y bienestar de los pacientes. En violeta, Intervenciones basadas en la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico y tratamiento de los síntomas neuropsiquiátricos. Tomado del National Institute on Aging (NIA), julio de 2022 (53).

2.14 El balance energético como factor en la enfermedad de Alzheimer

Cada vez existen más evidencias de que la enfermedad de Alzheimer es una patología mixta en la que existen múltiples factores que contribuyen al desarrollo de ésta, especialmente aquellos cambios que se observan en regiones periféricas. Está generalmente aceptado que la obesidad

y la diabetes en la mediana edad son factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, el cual se encuentra relacionado con la resistencia a insulina periférica, el estado inflamatorio del organismo y los problemas cardiovasculares que afectan a la irrigación sanguínea en el cerebro (275, 276). No obstante, si bien un índice de masa (IMC) elevado se considera indicativo de riesgo de padecer EA, estudios epidemiológicos han apreciado durante décadas que un IMC bajo y la pérdida de peso en la mediana edad se encuentran, a su vez, asociadas al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EA en los pacientes de avanzada edad (57). Los datos clínicos han demostrado que un bajo IMC y la pérdida de peso precede al desarrollo de la demencia en la EA y puede ser un indicador preclínico de la enfermedad (4, 277). Además, se sabe que los pacientes con un IMC bajo y alto presentan una mayor deposición de A β teniendo en cuenta factores como la edad, sexo, genotipo de APOE o diagnóstico de diabetes (278). Esta aparente paradoja se encuentra asociada a alteraciones en el sistema endocrino y la señalización de hormonas como la insulina, leptina o secretagogos de insulina, los cuales se describen a continuación.

2.14.1 Asociación entre la obesidad, resistencia a insulina, diabetes y enfermedad de Alzheimer

Se ha determinado a través de diversos estudios poblacionales que un IMC elevado y el padecimiento de obesidad en la mediana edad aumenta el riesgo de deterioro cognitivo (5, 279). Este aumento del riesgo, sin embargo, disminuye a medida que avanza la edad, de forma que mantener un IMC elevado está asociado con un menor riesgo de progreso de deterioro cognitivo leve hacia Alzheimer (279). A pesar de ello, existen divergencias en la forma de categorizar el riesgo de tener un IMC elevado con el desarrollo de EA, debido a la variabilidad e inconsistencia a la hora de determinar la progresión de demencia leve hacia Alzheimer o el ajuste de análisis con covariables que pueden influir en el riesgo *per se*, como pueden ser los factores de riesgo cardiovasculares o el genotipo de APOE en estos pacientes.

Uno de los principales factores relacionados con el sobrepeso es el desarrollo de la resistencia a insulina y, posteriormente, la diabetes de tipo 2 (*type 2 diabetes mellitus* (T2DM)). Se han identificado como causas de la resistencia a la insulina una acumulación excesiva de grasa blanca visceral, derivando en una sobreproducción de citoquinas inflamatorias que interfieren con la señalización de insulina y la liberación de lípidos que interfieren en la actividad mitocondrial de células sensibles a la actividad de la glucosa como los miocitos; así como niveles elevados en sangre de triglicéridos, los cuales interfieren con la función de las células β -pancreáticas (280, 281).

Existen evidencias de que la resistencia a la insulina central es, en muchos casos concomitante con la ocurrencia de resistencia a insulina periférica. Se ha observado que los pacientes con T2DM presentan una degeneración y atrofia en hipocampo, estriado ventral, cerebelo o putamen, de forma similar a los pacientes con EA, así como un deterioro cognitivo temprano (282, 283). Además, también se ha determinado que la resistencia a insulina en pacientes de mediana edad reduce la capacidad de utilizar la glucosa como fuente energética para sostener la actividad cerebral, así como un desacoplamiento del flujo sanguíneo vascular y la perfusión microvascular debido a cambios metabólicos inducidos por la oxidación de ácidos grasos, de forma similar a como se ha determinado en la EA (284, 285).

Por otra parte, en modelos animales expuestos a una dieta rica en grasas, se ha observado que el desarrollo de resistencia a insulina y T2DM produce una respuesta inflamatoria sistémica que

media en la neuroinflamación y la formación de placas de A β (37-40). La exposición a dietas ricas en grasas también produce cambios en la microbiota intestinal, resultando un aumento de niveles circulantes de citoquinas, quimiocinas y endotoxinas (286). De esta forma, la resistencia a insulina ligada a una pérdida de la función del endotelio vascular y un estado proinflamatorio crónico podrían derivar en un entorno adverso para la supervivencia neuronal y agravar el deterioro cognitivo en eventos observados en la patología de la EA.

2.14.2 Asociación entre la pérdida de peso no intencionada, la disfunción endocrina y enfermedad de Alzheimer

La pérdida de peso involuntaria es uno de los signos que pueden observarse durante el envejecimiento del organismo. En contraparte al riesgo asociado a la obesidad, estudios epidemiológicos han apreciado durante años que la pérdida de peso y un IMC bajo durante la mediana edad se encuentran asociadas a un mayor índice de fragilidad y al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EA en la vejez (2-9). De hecho, la pérdida de peso en personas cognitivamente normales es un indicativo de mayor riesgo de desarrollo de EA respecto a aquellas que mantienen su peso corporal con los años, y alrededor de un 40% de personas con demencia experimentan pérdida de peso (54-56).

El aumento de la presencia de marcadores de EA (A β y tau total) en el líquido cefalorraquídeo se ha correlacionado con la disminución del índice de masa corporal (IMC), lo que refuerza el vínculo entre el peso corporal y las alteraciones metabólicas con el desarrollo de demencia y EA (287). De hecho, un estudio en pacientes ha relacionado un bajo IMC durante la mediana edad con un aumento del plegamiento incorrecto del péptido A β en plasma, el cual es indicativo de la formación de agregados solubles como las especies oligoméricas tóxicas y un marcador de riesgo de EA en adultos de edad avanzada (57).

Las causas por las cuales se produce una pérdida de peso en la EA aún son ciertamente desconocidas. En general, la pérdida de peso se produce a través de un balance de energía negativo, en el cual la ingesta de calorías es inferior al gasto energético, en los cuales intervienen una serie de factores externos e internos. Análisis de pacientes han sugerido que alteraciones en los patrones de ingesta y el sueño se encuentran relacionados con la pérdida de peso (58, 59). Otros estudios han relacionado alteraciones en el metabolismo basal de pacientes con EA, con resultados contradictorios mostrando un estado hipermetabólico (288) e hipometabólico (289). El control del balance energético se encuentra finamente regulado por el hipotálamo, una región cerebral heterogénea próxima al tercer ventrículo cerebral con la capacidad de adaptar los mecanismos fisiológicos de ingesta y gasto energético a través del sistema endocrino y el sistema nervioso autónomo. Análisis *postmortem* han mostrado atrofia del hipotálamo en pacientes con EA. A pesar de la posible implicación del hipotálamo en la patología de la EA, existen pocos estudios al respecto dada la tendencia de subestimar las alteraciones metabólicas respecto a los signos de deterioro cognitivo en la EA. Otros estudios han encontrado una relación aparente con niveles bajos de la hormona insulina y leptina con el riesgo de desarrollar EA, los cuales también se encuentran relacionados con un bajo IMC. Estas hormonas participan en el control hipotalámico de la ingesta y la administración de recursos energéticos en el organismo, por lo que ambos rasgos podrían estar implicados. Además, existen evidencias que relacionan la EA con la incidencia de la menopausia y el riesgo de fractura ósea, los cuales se encuentran a su vez regulados por cambios hormonales controlados por el hipotálamo. En general, este

estado de energía negativa en los pacientes con EA correlacionado con la alteración de la señalización de la insulina en el cerebro refleja un estado de envejecimiento metabólico prematuro que puede exacerbar la patología de la EA. Sin embargo, los mecanismos que derivan en la pérdida de peso y el deterioro metabólico en pacientes con EA aún están poco descritos y podrían suponer una diana terapéutica poco explotada en la actualidad.

2.14.3 El control hipotalámico del balance energético en la EA

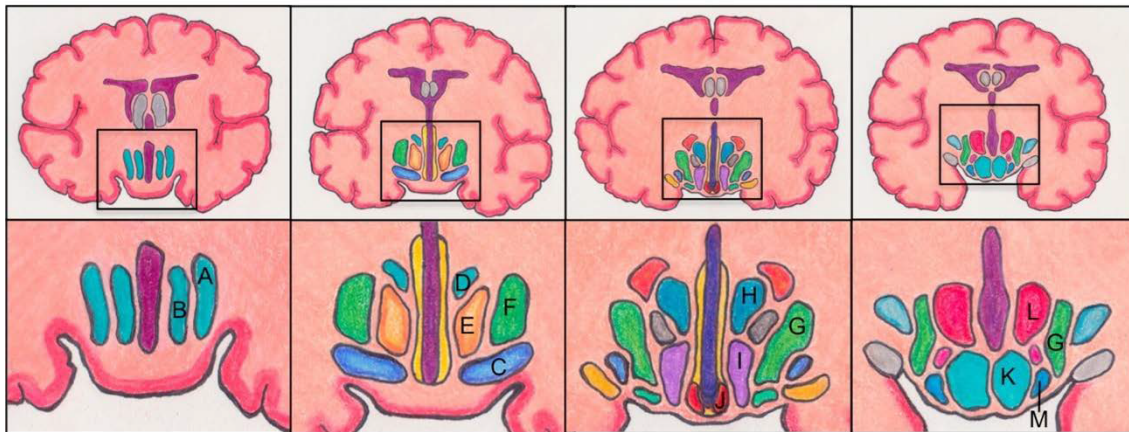
El hipotálamo es una región cerebral que consta de un conjunto de núcleos heterogéneos interconectados. Tiene una localización privilegiada en el cerebro, bordeando a la eminencia media, una franja ampliamente vascularizada del tercer ventrículo cerebral que atraviesa la parte medial-basal del hipotálamo y le permite tener un contacto estrecho con el líquido cefalorraquídeo, lo que le permite tener un fino control de los niveles de metabolitos como la glucosa, ácidos grasos, aminoácidos y hormonas en plasma. El hipotálamo puede dividirse en tres regiones diferenciadas: 1) región anterior (supraóptica), que engloba a los núcleos preóptico (*preoptic nucleus* (PON)), supraóptico (*supraoptic nucleus* (SON)), paraventricular (*paraventricular nucleus* (PVN)), hipotalámico anterior (*anterior hypothalamic nucleus* (AHN)), supraquiasmático (*suprachiasmatic nucleus* (SCN)) y parte del núcleo lateral (*latera nucleus* (LN)); 2) región medial (tuberal), que comprende los núcleos dorsomedial (*dorsomedial nucleus* (DMN)), ventromedial (*ventromedial nucleus* (VMN)), arcuato (*arcuate nucleus* (ARC)) y otra parte del LN; y 3) región posterior (mamilar), que acoge los núcleos mamilares (*mammillary nuclei* (MN)), posterior (*posterior nucleus* (PN)), tuberomamilar (*tuberomammillary nucleus* (TMN)) y también al LN. Cada núcleo hipotalámico está especializado y comprenden funciones como el control de la ingesta, sed, fases del sueño, temperatura corporal, respuestas de lucha-huida, funciones sexuales o respuestas de estrés. Estas funciones son reguladas a través de la capacidad del hipotálamo de hormonas al torrente sanguíneo de forma directa (por ejemplo: vasopresina, oxitocina), o a través de su conexión con la hipófisis (**Figura 5**). Además, el hipotálamo posee una amplia red de conexiones con otras regiones cerebrales como el tronco encefálico, partes del sistema límbico como la amígdala, hipocampo, y la propia comunicación entre distintos núcleos hipotalámicos.

En el hipotálamo, la ingesta de alimentos y el gasto energético se encuentra regulada por sensores metabólicos como mTOR y AMPK, proteínas cuya actividad es dependiente del estado energético de la célula y de la activación de vías de señalización de insulina o leptina, indicativas del estado energético del organismo. Las neuronas hipotalámicas sensibles a señales externas indicadoras del estado metabólico del organismo ejercen un control y activan mecanismos de compensación aumentando o disminuyendo la ingesta y el gasto metabólico a través de la secreción de neuropéptidos orexígenos como el neuropéptido Y (*neuropeptide Y* (NPY)), la proteína relacionada con el agutí (*agouti-related protein* (AgRP)) o la galanina (responsables de promover el apetito y disminuir la tasa metabólica) y los neuropéptidos anorexígenos proopiomelanocortina (*proopiomelanocortin* (POMC)) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript* (CART)) (que derivan en la saciedad y promueven el gasto energético) localizados en el ARC y conectados con el VMN, DMN y PVN. Otros neuropéptidos como la orexina o la hormona concentradora de melanina (*melanin-concentrating hormone* (MCH)), secretados en el LN, regulan la ingesta de forma dependiente al ritmo circadiano, o la irisina, relacionada con el gasto metabólico (**Figura 5**).

Existen evidencias en humanos que en la EA se produce una disfunción hipotalámica en las primeras etapas de la enfermedad que se asemeja parcialmente a los cambios acontecidos en otras regiones cerebrales como el hipotálamo, y que puede contribuir a los cambios metabólicos observados en los pacientes de EA. Estudios de MRI y microscopía electrónica (*electron microscopy* (EM)) revelan que los pacientes con EA presentan una atrofia cerebral, asociada a un aumento del volumen en el tercer ventrículo, mientras que estudios morfométricos confirman que en el hipotálamo se producen eventos neurodegenerativos característicos de la EA como alteraciones mitocondriales, distrofia de axones, reducción de la arborización de las dendritas neuronales y disminución de la población neuronal (60-62). No obstante, no se han encontrado evidencias suficientes de patología amiloide o NFTs de tau afectando de forma generalizada y consistente en el hipotálamo de pacientes de EA (62).

Una de las regiones hipotalámicas visiblemente más afectadas por la patología de la EA es el SCN, el cual se ve alterado durante el curso de la enfermedad, que concuerda con las alteraciones en el sueño y la fase REM que experimentan los pacientes de Alzheimer (290). Es plausible pensar que otros eventos que suceden en etapas prodrómicas de la EA como la pérdida de peso estén relacionados con una disfunción de aquellos núcleos hipotalámicos encargados del control del balance energético como el ARC. No obstante, los estudios en humanos acerca de posibles alteraciones en las neuronas que regulan la ingesta y gasto energético a través de los péptidos NPY, AgRP, POMC o CART son escasos. En el modelo murino 3xTg de la EA, con mutaciones en *APP*, *PS1* y *MAPT*, se ha observado una inflamación hipotalámica y una disminución de la población de neuronas NPY y POMC (63). En otro modelo murino Tg2576 de sobreexpresión de *APP*, se ha observado de forma similar neuroinflamación, una pérdida de función de NPY y una capacidad disminuida de respuesta de las neuronas productoras de NPY a la leptina, lo cual estaba asociado a un menor peso corporal (119). Dado que se han observado niveles reducidos de insulina y leptina como factores de riesgo de EA, es posible que el balance energético negativo en se produzca a través de una disfunción hipotalámica derivada de un estado de neuroinflamación y una disminución de la señalización endocrina, todos ellos factores que podrían estar interrelacionados entre sí.

Rostral → Caudal



| Núcleo (Etiqueta en imagen) | Región | Función | Neuropéptidos y neurotransmisores |
|-------------------------------------|---|---|--|
| Preóptico, lateral (A) y medial (B) | <ul style="list-style-type: none"> • Anterior • Preóptico • Medial | <ul style="list-style-type: none"> • Reproducción • Termorregulación • Comportamiento sexual | <ul style="list-style-type: none"> • GnRH |
| Supraóptico (C) | <ul style="list-style-type: none"> • Anterior • Medial | <ul style="list-style-type: none"> • Neurosecreción | <ul style="list-style-type: none"> • Vasopresina • Oxitocina |
| Paraventricular (D) | <ul style="list-style-type: none"> • Anterior • Medial | <ul style="list-style-type: none"> • Regulación hormonal • Balance de fluidos • Gastrointestinal • Cardiovascular | <ul style="list-style-type: none"> • TRH • CRH • Oxitocina • Somatostatina |
| Anterior (E) | <ul style="list-style-type: none"> • Anterior • Medial | <ul style="list-style-type: none"> • Termorregulación • Sudoración | <ul style="list-style-type: none"> • ? |
| Supraquiasmático (F) | <ul style="list-style-type: none"> • Anterior • Medial | <ul style="list-style-type: none"> • Ritmo circadiano | <ul style="list-style-type: none"> • Vasopresina • VIP • Neurotensina |
| Lateral (G) | <ul style="list-style-type: none"> • Anterior • Tuberal • Lateral | <ul style="list-style-type: none"> • Sed • Hambre • Sueño | <ul style="list-style-type: none"> • Orexina • MCH |
| Dorsomedial (H) | <ul style="list-style-type: none"> • Tuberal • Medial | <ul style="list-style-type: none"> • Cardiovascular • Gastrointestinal • Metabolismo sistémico | <ul style="list-style-type: none"> • NPY |
| Ventromedial (I) | <ul style="list-style-type: none"> • Tuberal • Medial | <ul style="list-style-type: none"> • Saciedad • Comportamiento sexual | <ul style="list-style-type: none"> • BDNF |
| Arcuato (J) | <ul style="list-style-type: none"> • Tuberal • Medial | <ul style="list-style-type: none"> • Control del apetito | <ul style="list-style-type: none"> • NPY • AgRP • POMC • CART |
| Mamilar (K) | <ul style="list-style-type: none"> • Posterior • Medial | <ul style="list-style-type: none"> • Memoria | <ul style="list-style-type: none"> • Glutamato • Encefalina • CCK |
| Posterior (L) | <ul style="list-style-type: none"> • Posterior • Medial | <ul style="list-style-type: none"> • Cardiovascular | <ul style="list-style-type: none"> • Dinorfina |
| Tuberomamilar (M) | <ul style="list-style-type: none"> • Posterior • Lateral | <ul style="list-style-type: none"> • Sueño • Metabolismo sistémico | <ul style="list-style-type: none"> • Histamina |

Figura 5. Estructuras y funciones de los núcleos hipotalámicos. AgRP - proteína relacionada con el agutí; BDNF – factor neurotrófico derivado del cerebro; CART - transcrito regulado por cocaína y anfetamina; CCK – colecistoquinina; CRH – hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa; GnRH – hormona liberadora de gonadotropina; MCH – hormona concentradora de melanina; NPY – neuropéptido Y; POMC – proopiomelanocortina; TRH – hormona liberadora de tirotrina; VIP - péptido vasoactivo intestinal. Adaptado de Ishii e Iadecola, 2015 (291).

2.14.4 Pérdida de señalización de insulina en la EA

Como se ha descrito antes, existen diversos estudios poblacionales que han relacionado durante tiempo la diabetes con el riesgo de padecer demencia, y más en concreto la demencia de tipo Alzheimer. La T2DM se relaciona en un principio con elevados niveles de insulina en plasma, debido a un mecanismo de sobrecompensación en la que mayores cantidades de insulina son necesarias para sobreponerse a la pérdida de sensibilidad de los tejidos a ésta. Los mecanismos patogénicos asociados a la resistencia a insulina periférica en el cerebro han sido descritos en el **apartado 2.12**.

Por el contrario, existen estudios epidemiológicos que han relacionado niveles bajos de insulina con el riesgo de padecer EA. Sendos estudios en poblaciones de hombres y mujeres han determinado que niveles excesivamente bajos de insulina basal en plasma son mayores predictores de riesgo para el desarrollo de demencia y EA en comparación con niveles altos de insulina, independientemente del desarrollo preclínico de T2DM (10, 11) (**Figura 6**). De hecho, aquellos pacientes con niveles basales menores de insulina estaban relacionados con un menor IMC, evidenciando que los bajos niveles de insulina reflejan un estado metabólico alterado en el organismo. De hecho, un estudio reciente en pacientes mayores de 50 años ha determinado mediante MRI que niveles bajos de insulina estaban asociados con una atrofia del hipocampo, y que éstos pacientes presentaban menor IMC (292). Además, se ha observado en pacientes de entre 60 y 80 años de edad que niveles bajos de insulina en plasma en aquellos pacientes de mayor edad se encontraba asociado a mayores niveles de A β en plasma y en regiones cerebrales afectadas por la patología amiloide (293, 294). En conjunto con estos estudios, se ha visto que la diabetes de tipo 1 (*type 1 diabetes mellitus* (T1DM)), la cual se relaciona con una disfunción pancreática y niveles bajos de insulina en sangre, se encuentra asociada a complicaciones micro- y macrovasculares y se ha observado que los pacientes con T1DM con un pobre control glucémico tienen un riesgo incrementado de desarrollar demencia (295).

El descenso de insulina basal en plasma es posiblemente debido a un deterioro metabólico del organismo que ocurre con la edad. De hecho, el envejecimiento reduce la actividad de las células β -pancreáticas. Por tanto, niveles bajos de insulina podrían ser indicativos de un envejecimiento prematuro, que podría encontrarse relacionado con la EA en sus estadios iniciales. A pesar de que no existen evidencias en humanos, un estudio en el modelo murino de EA, el ratón 3xTg, ha determinado la pérdida de masa de células β -pancreáticas, interfiriendo con la liberación de insulina y la homeostasis de la glucosa (10, 64, 65). Se ha mostrado que los islotes pancreáticos de humanos y ratones expresan APP, y que la formación de la fracción soluble sAPP estimula la secreción de insulina, pero no de glucagón, por lo que es posible que los pacientes de EA presenten alteraciones en el procesamiento de APP pancreático, afectando a la capacidad de liberación de la insulina de las células β -pancreáticas (296). La secreción de insulina también se encuentra regulada por hormonas secretagogas como el polipéptido inhibidor gástrico (*gastric inhibitory polypeptide* (GIP)) o el péptido similar a glucagón 1 (*glucagón-like peptide 1* (GLP-1)). Existen resultados contradictorios sobre la asociación entre los niveles de GLP-1 o GIP en humanos y el riesgo del desarrollo de la EA. Aún no se ha determinado si existe una posible relación entre niveles bajos de las hormonas secretagogas de insulina con los niveles plasmáticos de la propia insulina. Otra de las hormonas relacionadas con la insulina es la leptina, cuyos niveles en plasma son dependientes del volumen de tejido adiposo blanco visceral. Estudios epidemiológicos han observado que los niveles de plasma de leptina son generalmente más bajos en pacientes con demencia y EA, (66). No obstante, esta asociación se ha encontrado en pacientes de avanzada edad, por lo que los niveles reducidos de leptina podrían ser una consecuencia secundaria de la pérdida de peso que se produce en estadios más tempranos.

La secreción de insulina se encuentra regulada también por el hipotálamo, y la señalización de insulina en el hipotálamo es esencial para iniciar mecanismos para el control de la glucemia y el mantenimiento del peso corporal. Además, la insulina es un factor trófico que promueve la proliferación de neuronas y el mantenimiento de neuritas. Si bien en la T2DM se observan niveles elevados de insulina en plasma, la disrupción del transporte de insulina a través de la barrera hematoencefálica conlleva un descenso en los niveles de insulina en el líquido cefalorraquídeo, de forma similar a como ocurriría en aquellos pacientes con niveles bajos de insulina en plasma, por lo que estos dos eventos, en principio contrarios, podrían resultar ambos en una disfunción de la señalización de insulina en el cerebro y un agravamiento de la patología de Alzheimer.

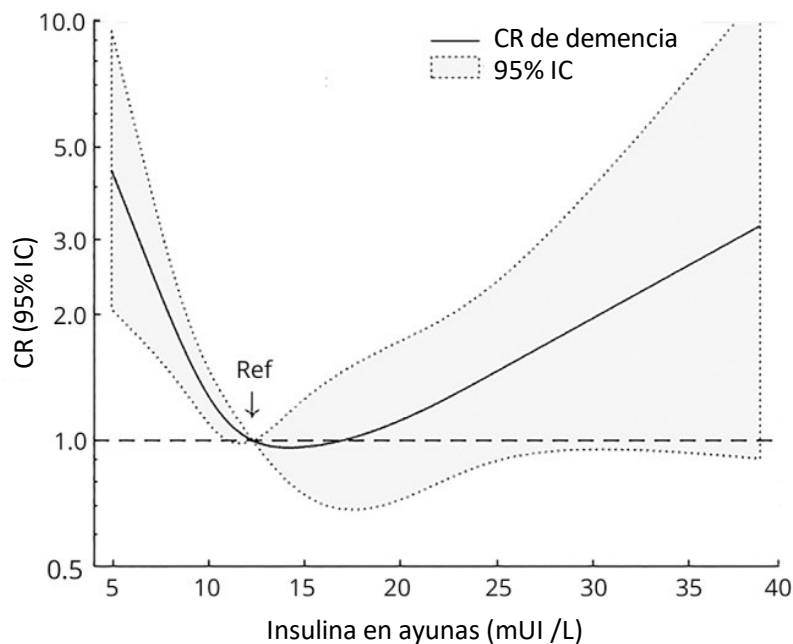


Figura 6. Riesgo de demencia en función de los niveles de insulina plasmática. CR - cociente de riesgo; IC - intervalo de confianza; UI - unidad internacional. Adaptado de Mehlig et al., 2018 (11).

2.14.5 Asociación de la osteoporosis con la enfermedad de Alzheimer

En los últimos años han surgido investigaciones que ponen de manifiesto la existencia de comorbilidad entre la baja densidad mineral ósea, la osteoporosis y la fractura ósea en pacientes con demencia (67-69). Estos estudios demuestran que estos pacientes presentan más del doble de riesgo (2,5-2,7 veces) de experimentar disminución de densidad ósea y fracturas que sujetos de la misma edad y sin enfermedad neurodegenerativa.

Una de las principales diferencias de la osteoporosis en hombres y mujeres de avanzada edad, es que las segundas tienen una menor fracción de volumen óseo, un menor engrosamiento trabecular y una menor calidad del hueso (madurez ósea y contenidos en carbonatos y fosfatos), medidas mediante técnicas de espectroscopía vibracional (FTIR-ATR), que el hueso de los hombres de la misma edad (297).

El riesgo de EA en la osteoporosis y el riesgo de osteoporosis en EA son dos condiciones diferentes que pueden estar relacionadas mediante un mecanismo común en ambas patologías

todavía desconocido (136). En relación a lo expuesto, un estudio prospectivo ha demostrado que una menor densidad de masa ósea y mayores rangos de pérdida de hueso, medidos mediante difracción de rayos X (DRX), se relacionan con un mayor riesgo de EA tanto en hombres como en mujeres (137), sugiriendo una relación intrínseca y estrecha entre osteoporosis y EA. Así mismo, también ha sido demostrado un incremento de la demencia en pacientes con osteoporosis (298, 299). La asociación entre osteoporosis y EA también está vinculada a un descenso en la calidad del hueso que resulta en una mayor fragilidad de éste y que tienen como consecuencia frecuentes fracturas no traumáticas en estos pacientes (2,5-2,7 veces mayor riesgo), lo que disminuirá aún más su calidad de vida.

La conexión entre cerebro y hueso se produce a través del control del sistema nervioso autónomo sobre el balance dinámico de la remodelación del hueso. Cambios en el balance energético alteran la actividad de reabsorción mineral por parte de los osteoclastos y la formación del hueso por parte de los osteoblastos (69). El sistema nervioso central regula los efectos de la señalización del sistema nervioso autónomo sobre el hueso a través del núcleo del rafe dorsal y el VMN del hipotálamo. En este sentido estudios de neuroimagen mediante MRI han demostrado una correlación entre reducciones en el volumen del hipotálamo en pacientes de Alzheimer en estadio temprano con una menor densidad mineral ósea (70). Además, se ha demostrado en un modelo murino de sobreexpresión de tau que existe un patrón de hiperfosforilación de tau en el núcleo del rafe dorsal, una pérdida de la población neuronal serotoninérgica (fundamentales en la regulación del esqueleto adulto) y una asociación de estos eventos con una disminución de la densidad mineral ósea (*bone mineral density* (BMD)) (300). Se han descrito también otros fenotipos osteoporóticos en ratones con mutaciones de EA Familiar de sobreexpresión de APP y PS1 (69). Además, estudios en cultivo han demostrado que la proteína A β inhibe la proliferación de osteoblastos y facilita la activación de osteoclastos, mediante la activación de las rutas de NF- κ B, ERK y la oscilación de calcio (140, 141). Todas estas observaciones confirman una menor densidad ósea, una peor microarquitectura esquelética y una disminuida fortaleza del hueso en los mutantes murinos de Alzheimer (301).

Es importante entender los procesos fisiopatológicos (composición y remodelación ósea) que ocurren durante la degeneración del hueso durante el envejecimiento como factor de riesgo diferencial ligado al sexo en enfermedades neurodegenerativas tales como EA. Comprender estos mecanismos va a permitir identificar dianas terapéuticas que permitan una intervención clínica temprana.

2.14.6 Asociación entre la menopausia y la enfermedad de Alzheimer

Uno de los principales factores del mayor riesgo de EA en mujeres respecto a hombres es su mayor esperanza de vida en comparación (302). No obstante, durante la mediana edad, existen factores hormonales que parecen indicar que una disminución de los niveles de hormonas esteroideas como los estrógenos durante la menopausia son factores de riesgo para la incidencia de la EA (71). De hecho, el tratamiento de reemplazo hormonal con estrógenos y progesterona exógena disminuye el riesgo de sufrir demencia y EA en mujeres en etapa postmenopáusica (71, 303, 304). Se ha descrito en modelos animales que el estrógeno confiere efectos neuroprotectores, promueve el uso de glucosa en el cerebro y promueve la expresión de APOE y diversos genes que se ven apagados durante el transcurso de la EA (305-307). Por otro lado, se ha descrito que los niveles elevados de la hormona foliculoestimulante (*follicle-stimulating hormone* (FSH)), los cuales se incrementan durante la perimenopausia, se encuentran asociados

a una mayor incidencia de demencia de tipo Alzheimer (308-310). De hecho, se ha demostrado en el modelo murino de EA, el ratón 3xTg, que la FSH actúa directamente acelerando la deposición de placas A β y la formación de NFTs de tau en neuronal del hipocampo y corteza y acelerando el deterioro cognitivo (72).

A pesar de que el tratamiento hormonal en mujeres es una diana terapéutica prometedora, aún no hay resultados clínicos del efecto neuroprotector de los estrógenos en la EA con resultados concluyentes (311). La variabilidad temporal en los cambios en los niveles hormonales entre hombres y mujeres, y la falta de diseños clínicos y análisis desde la perspectiva de género son componentes que influyen negativamente en los resultados de farmacoterapias que reduzcan la incidencia de la menopausia en los estudios clínicos con pacientes con EA.

2.14.7 El hígado como reservorio de energía y eliminación de A β

Uno de los mecanismos descritos para la reducción de la carga de A β en el cerebro se da a través de su trasvase a la circulación sistémica y su eliminación en órganos como el hígado, los riñones o el tracto gastrointestinal. Este mecanismo comienza a través de la unión del péptido A β a APOE, formando un complejo que atraviesa la barrera hematoencefálica gracias a la unión de APOE al receptor LRP1, como se ha descrito en el **apartado 2.6.6** (33). De hecho, la eliminación de A β en la periferia reduce la carga de A β en el cerebro (73).

LRP1 se encuentra en el hígado, y es el mayor responsable de la eliminación de A β sistémico a nivel hepático (312-314). La eliminación de A β en el hígado ocurre gracias a APOE, la cual se une a los receptores LRP1 del hígado y lo internaliza vía transcitosis, promoviendo su eliminación y siendo la isoforma APOE- ϵ 4 la menos eficaz (315, 316). La A β internalizada en el hígado es degradada directamente en el hígado o eliminada a través de la excreción biliar, mediada gracias a la Pgp (316, 317). De hecho, se ha visto que la degradación de A β en extractos de hígados de pacientes con EA es menor que en la de pacientes sin EA, lo cual apunta a una relación entre la disfunción hepática y la patología amiloide, en una relación de causa-efecto (74). Además, un aumento de la degradación hepática de A β previene el deterioro cognitivo en modelos murinos de EA (75).

La contribución del hígado a la eliminación del A β sugiere que la incidencia de problemas hepáticos podría ser un indicador de riesgo para la EA. En modelos animales se ha observado que la esteatohepatitis no alcohólica (*non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD)) induce signos de la EA como la neuroinflamación y la acumulación de placas de A β (76). Uno de los principales eventos que ocurren junto a la NAFLD suelen ser el síndrome metabólico y la resistencia a insulina, de forma que, aunque la insulina es incapaz de aumentar las reservas de glucógeno en el hígado, sí que promueve la síntesis de lípidos, que, unido a una mayor liberación de lípidos en circulación, promueve la generación de hígado graso. La disfunción hepática está acompañada por una menor expresión de LRP1 en el hígado, y la señalización de insulina promueve la traslocación a la membrana celular de LRP1 en hepatocitos y la eliminación de A β (318). De hecho, se ha observado en el modelo murino 5xFAD de la EA, que la sobreexpresión de A β humana en el hígado provoca deterioro cognitivo y acumulación de grasa hepática, lo cual sugiere un papel de A β en el metabolismo hepático que podría contribuir al desarrollo de la NAFLD (77). Además de la NAFLD, otras patologías hepáticas como la cirrosis o la inflamación causada por el virus de la hepatitis B también disminuyen la capacidad hepática de eliminar A β y podrían estar asociadas a un mayor riesgo de EA (78, 79) (**Figura 7**). El hecho de que la disfunción hepática y la pérdida de la capacidad de eliminación de A β sistémica en el hígado sea

un factor de riesgo de EA abre una nueva diana de intervención para prevenir los signos de la EA, poniendo el foco en la salud metabólica general como factor de peso en el desarrollo de la EA.

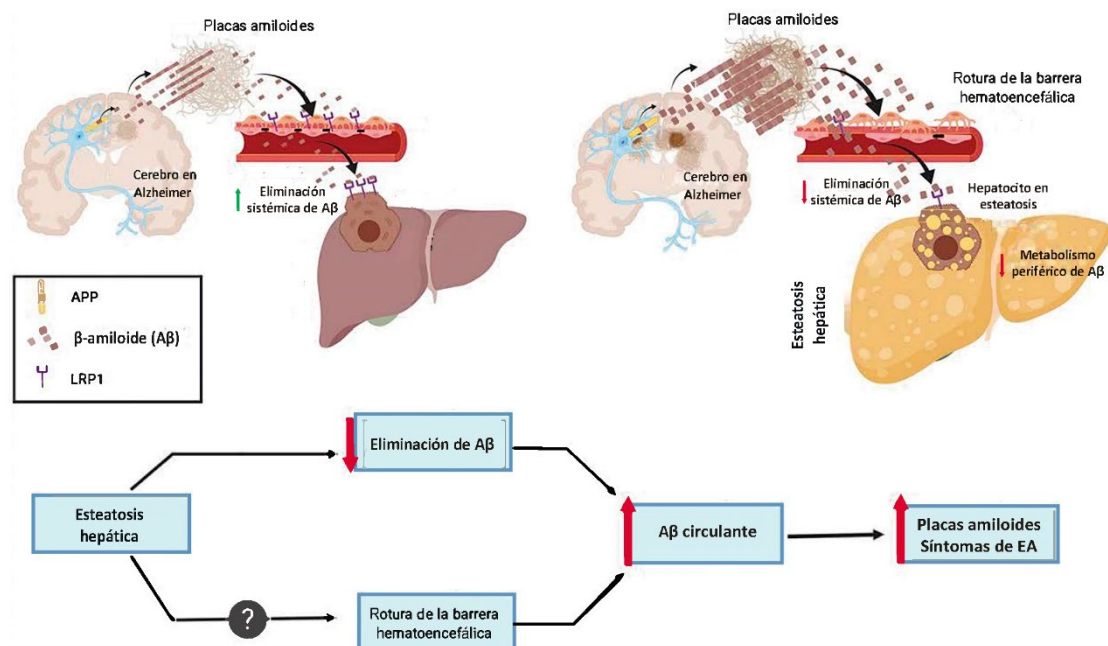


Figura 7. La patología hepática de esteatosis puede incrementar la carga de proteína amiloide en el cerebro de los enfermos de Alzheimer a través de un mecanismo defectuoso de la eliminación de Aβ sistémica. Esto sucede a partir del descenso de los niveles del receptor LRP1, disfunción hepática e inflamación crónica, que pueden alterar la estructura de la barrera hematoencefálica y en un círculo vicioso. Adaptado de Estrada et al., 2019 (319).

2.15 El metabolismo y la insulina y como dianas terapéuticas: el D-Chiro-inositol como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer

Actualmente, no existen terapias efectivas para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer, debido a la principal problemática de que aquellos tratamientos diseñados para la eliminación de Aβ y para prevenir la hiperfosforilación de tau y su posterior agregación fallan cuando alcanzan los últimos estadios de la fase clínica al no ser capaces de revertir un proceso de neurodegeneración que lleva ocurriendo a nivel celular y molecular años atrás del inicio de la manifestación de tipo cognitivo. Como se ha descrito en apartados anteriores, existe una coyuntura en el organismo a nivel metabólico que es indicativo de que la patología de Alzheimer cursa con una serie de cambios o alteraciones en el organismo, como variaciones en el peso corporal, pérdida de señalización de insulina y otras hormonas, así como la comorbilidad hepática que influye negativamente en la eliminación sistémica de Aβ.

2.15.1 La insulina como diana terapéutica en la demencia y enfermedad de Alzheimer

Actualmente existen diversos estudios preclínicos y ensayos clínicos basados en el uso de fármacos como la metformina, que estimula la liberación de insulina mediante la activación de AMPK en las células β -pancreáticas; inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (*dipeptidyl peptidase 4* (DPP-4), que anulan la acción inhibitoria de la DPP-4 sobre GLP1 y GIP, estimuladoras de la secreción de insulina; sulfonilureas, que promueven la liberación de insulina al cerrar los canales de K^+ en las células β -pancreáticas; inhibidores de SGLT-2, que también promueven la liberación de insulina en las células β -pancreáticas; tiazolidinedionas (TZD), que se unen al receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR- γ)); así como la propia insulina administrada de forma intranasal, como posibles tratamientos farmacológicos teniendo como diana la disfunción de la señalización de insulina central y sistémica que se observa en la EA (320-326). La metformina y la insulina intranasal han mostrado resultados dispares en los ensayos clínicos hasta la fecha, de forma que se ha visto una interacción entre APOE- ϵ 4 y la metformina e insulina la cual deriva en un deterioro de las funciones cognitivas (323, 327). Otros estudios, sin embargo, han mostrado el efecto contrario, en tanto que, en algunos casos, no se ha observado mejora a largo plazo (321, 328). En tanto que existen estudios del uso de la insulina intranasal en individuos no obesos y sin patología diabética, apenas hay datos del uso de otros fármacos como la metformina en ensayos clínicos en pacientes sin T2DM (329).

La insulina intranasal cuenta con la ventaja de biodisponibilidad y evita su paso por el hígado, siendo el fármaco que presenta un mejor pronóstico en el tratamiento de la EA. El uso de estos tratamientos farmacológicos, además, desempeña ciertos retos asociados a la seguridad del tratamiento, biodisponibilidad y efectos no deseados en el organismo. La metformina presenta una pobre absorción oral y puede producir problemas gastrointestinales al igual que los inhibidores de DPP-4, mientras que las TZDs pueden provocar edemas y pérdida de densidad ósea (330) y la insulina intranasal en altas dosis puede provocar aumento de la presión arterial e incrementos en los niveles de cortisol y hormona de crecimiento (*growth hormone* (GH)) (331, 332).

En general, aunque la insulina es una clara diana terapéutica en la EA, aún se necesitan soslayar los principales problemas que acarrear los tratamientos en estadios preclínicos, cuando se observan patrones de desregulación metabólica que pueden ser indicativos del riesgo de EA. Se abre la necesidad de un tratamiento que pueda suministrarse de forma segura, cuya vía de administración sea manejable para el paciente facilitando su uso y con un mecanismo farmacológico mayormente conocido. Ante esta tesitura, una de las alternativas propuestas es el uso de nutracéuticos como el DCI, un compuesto normalmente incorporado en la dieta e intermediario de la ruta de señalización no canónica de la insulina, que promueve la secreción de ésta, actividad antioxidante, antiinflamatoria y cuyo uso es seguro. Se ha realizado una descripción detallada del origen del DCI, sus fuentes de obtención, su mecanismo de acción y las perspectivas como tratamiento para enfermedades neurodegenerativas en la EA en el primer artículo incluido en esta tesis doctoral (263). Se incluye una pequeña descripción de éstas en el siguiente apartado de la introducción. Además, el estudio de la eficacia del DCI en modelos de la EA podría proporcionar una alternativa traslacional de un producto seguro que permita iniciar intervenciones tempranas para modificar el curso de la enfermedad.

2.15.2 D-Chiro-inositol: obtención, mecanismo de acción y su uso como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer

Los inositoles son alcoholes cíclicos similares al azúcar, constituyentes de las células, que normalmente se incorporan como parte de la dieta humana. Dada su estructura, existen al menos ocho isómeros de inositoles que se encuentran en la naturaleza (myo-, muco-, neo-, scyllo-, l-chiro-, d-chiro-, epi-, y allo-inositol) y uno no que aparece en la naturaleza (cis-inositol). Muchos extractos de hierbas contienen derivados de metil-inositol como el D-Pinitol (*3- α -methyl-d-chiro-inositol* (DPIN)), el cual es el precursor del DCI. Los inositoles como el myo-inositol o el DCI cumplen una función osmótica en las plantas y el DCI se encuentra en altas cantidades en vegetales como el trigo, la soja o la algarroba. La obtención del DCI se produce normalmente por separación cromatográfica y cristalización hasta obtener el compuesto puro. En humanos, el DCI puro administrado de forma oral tiene alcanza su concentración máxima en plasma a las 5 horas y su uso no refiere ningún efecto secundario señalado tras varios años de investigación farmacocinética y farmacodinámica (12).

2.15.3 D-Chiro-inositol y la señalización de insulina

Una de las propuestas del mecanismo de acción de los inositoles en la señalización de insulina es a través de la formación de fosfoinosítidos, fosfolípidos ácidos de membranas celulares que interactúan con proteínas y participan en la transducción de la señalización de insulina y el factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (*insulin-like growth factor 1* (IGF-1) y actúan como segundos mensajeros en la vía de señalización de PI3K/AKT. Además, la incorporación del DCI a fosfolípidos de membrana formando IPGs hace que sean sustratos para la actividad de la fosfolipasa D (PLD), que puede mediar la activación de rutas no canónicas de la insulina, que a través de la PLD escinde la unión del IPG a la membrana y facilitan la actividad de la proteína quinasa pp59^{Lyn}, previamente unida a la caveolina, mediando la fosforilación de IRS1 o IRS2. Entre todos los inositoles, el DCI ha demostrado tener una bioactividad sinérgica y diferencial, lo que lo convierte en un buen candidato para la suplementación dietética. El DCI es capaz de activar per se la vía PI3K/AKT y juega un papel crucial en la actividad de la insulina (4).

Se ha observado que la administración de DPIN y DCI en forma de IPGs promueven la liberación de insulina en un mecanismo similar al producido por la glucosa en las células β -pancreáticas (81-83). Sin embargo, en estados de resistencia a insulina e hiperinsulinemia, la administración de DCI promueve la señalización de insulina en los tejidos diana y reduce la secreción de insulina en un mecanismo de retroalimentación negativa (333). La administración de DPIN y DCI, además, previenen la pérdida de peso producida en modelos animales con deficiencia de insulina, promueven la lipogénesis en adipocitos de forma sinérgica con los estrógenos y ejerce un mecanismo hepatoprotector (84-86). Los bajos niveles circulantes y la excreción alterada de DCI en humanos son indicativos de resistencia a la insulina y se observa un contenido reducido de DCI en patologías derivadas de la resistencia a la insulina, como diabetes mellitus gestacional, síndrome metabólico y síndrome de ovario poliquístico (*polycystic ovary syndrome* (PCOS)). La suplementación con DCI ha demostrado mejorar la sensibilidad a la insulina en modelos de diabetes inducido por dieta y está indicada para mujeres con resistencia a la insulina y PCOS, disminuyendo los andrógenos séricos y mejorando la ovulación.

2.15.4 D-Chiro-inositol y su uso como tratamiento en la enfermedad de Alzheimer

A través de diversos estudios, se ha observado que el DCI o su análogo DPIN actúan sobre diversas dianas comunes en la enfermedad de Alzheimer. A nivel central, el DCI es transportado a través de la barrera hematoencefálica, promoviendo la señalización de insulina en el cerebro. En estudios *in vitro* en neuronas de hipocampo, se ha demostrado que el DCI estimula la señalización de insulina, disminuyendo la toxicidad de oligómeros solubles de A β en neuritas (1). El DPIN, a su vez, ha mostrado además tener una actividad inhibitoria selectiva de la γ -secretasa disminuyendo el procesamiento de APP, pero no de notch. Además, el DPIN administrado de forma oral es capaz de disminuir la hiperfosforilación de tau en roedores en un mecanismo asociado a la reducción de la actividad de CDK5, quinasa de la proteína tau (87, 88).

En la periferia, se ha mostrado que el DCI es capaz de regular y promover la señalización de insulina, cuyos niveles alterados son un factor de riesgo de EA. Se ha mostrado que el DPIN es eficaz a la hora de revertir los cambios metabólicos derivados de la deficiencia de insulina, como la pérdida de peso en modelos murinos de diabetes inducida por la inyección de estreptozotocina (*streptozotocin* (STZ)) (84). Además, se ha observado que el DCI es capaz de prevenir el desarrollo de disfunción vascular asociada a la inflamación del endotelio de los vasos sanguíneos. La administración de DCI y DPIN han mostrado tener capacidad antiinflamatoria, disminuyendo la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 o resistina, además de reducir la producción de ROS aumentando la actividad del glutatión (*glutathione* (GSH)) durante el estrés oxidativo (96, 334). Estos resultados sugieren que el DCI tiene un potencial terapéutico como tratamiento en el deterioro metabólico temprano de la señalización de la insulina y el desarrollo de la disfunción vascular, que promueven el estrés oxidativo y la liberación de citoquinas proinflamatorias, contribuyendo en última instancia a la patología amiloide en el contexto de la resistencia cerebral a la insulina en el Alzheimer. Por ello, uno de los objetivos de esta tesis es evaluar la DCI en el metabolismo central y periférico de un modelo de EA para evitar la comorbilidad derivada de un envejecimiento prematuro del organismo.

2.16 Modelos animales de la enfermedad de Alzheimer: el ratón 5xFAD

A lo largo de los años, la investigación de la EA se ha servido del uso de modelos animales que recapitulan los eventos biológicos y el fenotipo de deterioro cognitivo observado en la enfermedad. A pesar de que hasta el 99% de los casos de EA se corresponden a un origen de tipo esporádico, existen pocos modelos animales mamíferos (por proximidad a los humanos) en la naturaleza que reproduzcan de forma similar en cuanto a patrón biológico, incluyendo la dispersión de A β y la formación de NFTs de tau en el cerebro, los síntomas cognitivos y la edad de inicio de éstos. Entre ellos se encuentran las ovejas, cabras, chimpancés, perros y el degú de la Patagonia (335-339). Los perros de la raza *Beagle* han sido ampliamente utilizados hasta la fecha en la investigación de EA esporádica, puesto que recapitulan un fenotipo de formación progresiva de placas difusas de A β , disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, así como un fenotipo de demencia de AD temprano en la mediana edad (340). Estas características son observadas también en otros modelos animales de EA, mientras que el *Beagle* no presenta formación de NFTs de tau (335). La perspectiva del uso de mamíferos superiores no primates en la investigación no está exenta de conflictos éticos, dado que estos animales tienen características cognitivas que hace que tengan requerimientos de compañía, mantenimiento,

capacidad de sufrimiento y alteraciones biológicas por estados de estrés al ser sometidos a experimentos que impiden su uso en investigación. Además, la esperanza de vida prolongada de estos animales, si bien repercute de forma positiva al acercarse a la humana y reproducir de forma temporal los eventos de la EA, requiere de muchos años de cría con el consiguiente aumento del costo de mantenimiento (añadido al tamaño y espacio requerido por éstos) y retardo de un proceso de investigación en el que es necesario obtener generar resultados reproducibles en un espacio corto de tiempo (341).

La alternativa animal a los modelos de EA esporádica ha sido, desde hace dos décadas, el desarrollo de modelos murinos que portan mutaciones normalmente asociadas a la EA familiar en los genes *APP*, *PSEN1* y *MAPT*. El modelo murino presenta varias ventajas: adaptabilidad a entornos de espacio reducido, facilidad de manejo y mantenimiento, similitud fisiológica a los humanos y un ciclo de vida corto. Actualmente, existen 197 modelos de ratón de la EA, de los cuales 131 presentan al menos una mutación correspondiente a la sobreexpresión de uno de los tres genes anteriormente mencionados, mientras que el resto se basan en mutaciones en genes de riesgo de EA como *APOE*, *TREM2* o las β -secretasas (ver: <https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>). Estos modelos animales tratan de reproducir las alteraciones patológicas de la EA, no obstante, no son capaces de reproducir con total fidelidad la patología amiloide tanto a nivel biológico como en las características cognitivas desarrolladas. La mayoría de los modelos basados en mutaciones de *APP* y *PS1* combinadas, promueven la formación de fragmentos de $A\beta_{1-42}$ y la acumulación de placas difusas y seniles. Sin embargo, no se observa en ninguno de estos modelos la formación de NFTs de tau, lo cual puede ser debido a diferencias en la respuesta inmune entre ratones y humanos o a otros factores que en humanos promueven la hiperfosforilación de tau de forma indirecta a la acumulación de $A\beta$ que no se da en ratones. Aquellos modelos que generan una respuesta más similar a la patología del Alzheimer en humanos (deposición de $A\beta$ en placas difusas y neuríticas, respuesta inflamatoria y activación glial, pérdida neuronal y pérdida sináptica) sin la formación de NFTs de tau son los modelos APP751SL/PS1M146L, APP751SL/PS1-KI y el 5xFAD, llamados así por las mutaciones específicas en *APP* y *PS1* (13-15). A su vez, de estos modelos, sólo el 5xFAD exhibe un patrón de neurodegeneración específico y secuencial en las regiones límbicas, mientras que la patología amiloide es extensiva y no localizada en el resto de modelos de mutaciones de *APP* y *PS1* (14). En otros modelos animales, se ha conseguido reproducir la formación de NFTs introduciendo mutaciones en el gen de tau (*MAPT*), de forma que el modelo 3xTg combina una mutación en *APP*, *PS1* y *MAPT*, reproduciendo la patología amiloide y la formación de NFTs de tau hiperfosforilada (342, 343). No obstante, este modelo cuenta con la desventaja de no generar una pérdida neuronal destacada en las regiones cerebrales, además de contar con una mutación en *MAPT*, gen que nunca se ha descrito una mutación en humanos que sea causante de la EA (343).

En resumen, a pesar del desarrollo de modelos animales que tratan de mimetizar el desarrollo de la EA en humanos, hasta el momento la mayoría de las estrategias farmacológicas probadas en la fase preclínica en estos modelos fracasan en su intento de alcanzar el mercado durante los últimos estadios de ensayos clínicos en humanos. Las causas son diversas, como por ejemplo, la idoneidad y el tamaño muestral de pacientes, la falta de valoración de otros factores que puedan interactuar con la diana farmacológica, la poca idoneidad de la propia diana farmacológica o la reproducibilidad de los efectos en animales y su poca traslación a los humanos por la poca correlación del modelo animal con la EA en humanos o el desconocimiento del mecanismo de acción del fármaco en otros sistemas del organismo (344). Es por ello por lo que se hace

necesario el desarrollo de nuevos modelos murinos de la EA y su caracterización fisiológica detallada para el desarrollo de nuevas terapias (345).

Hasta la fecha, el modelo 5xFAD es el que muestra una mayor similitud en los eventos celulares y moleculares de la patología amiloide humana. Estos ratones transgénicos sobreexpresan mutaciones que afectan tanto a *APP*: mutaciones *Swedish* (K670N, M671L), *Florida* (I716V), y *London* (V717I) que originan *Familial Alzheimer's Disease* (FAD) así como mutaciones en *PS1*: M146L and L286V. La expresión de ambos transgenes en el cerebro (5 mutaciones humanas causantes de Alzheimer familiar (5xFAD)) logra reproducir en un breve plazo de tiempo los principales rasgos de la EA, con deposición de A β y respuesta inflamatoria en el hipocampo y la corteza y con una edad de inicio de síntomas cognitivos alrededor de los 5-6 meses y hasta los 9 meses, de forma que facilita el seguimiento de los cambios fenotípicos que reproducen la EA en este modelo murino (14, 346) (**Figura 8**). Es por ello por lo que el modelo 5xFAD ha sido el escogido para el estudio de esta tesis doctoral.

Hasta ahora se conocen pocos datos de los cambios metabólicos que ocurren en el modelo 5xFAD y que podrían suceder de forma coetánea y/o contribuir a la patología de la EA y al desarrollo de los síntomas cognitivos en ésta. Los estudios más recientes, que aún no se habían publicado al inicio del trabajo de esta tesis doctoral, han mostrado que los animales 5xFAD presentan menor peso corporal a los 6-9 meses de edad en machos y hembras, problemas en la ingesta y niveles menores de ácidos grasos y colesterol en plasma (347-350). Sin embargo, se desconocen los mecanismos que derivan en una pérdida de peso en los ratones 5xFAD. Hasta el momento, no se ha descrito en ratones 5xFAD que se dé patología amiloide mediante histología y técnicas de neuroimagen en el hipotálamo, la principal región encargada del control de la ingesta y el gasto metabólico, por lo que su análisis es clave para comprender los mecanismos de pérdida de peso que podrían derivar en un deterioro metabólico y cognitivo acelerado. Además, otros modelos murinos de EA como el ratón 3xTg ha mostrado deficiencias en la señalización endocrina de leptina, los cuales derivan en una disfunción hipotalámica y una pérdida de peso descontrolada. La patología de la EA en humanos sugiere que los ratones 5xFAD podrían reproducir la pérdida de señalización de insulina, lo cual podría estar relacionado con los cambios metabólicos que suceden en el organismo. Si bien se ha descrito que la expresión de A β humana en el hígado de ratones 5xFAD agrava el deterioro cognitivo, aún se desconoce la implicación de éste órgano en la patología amiloide y su nexo al balance energético negativo del modelo 5xFAD (77). El estudio de estos cambios metabólicos podría proporcionar información para la detección de posibles biomarcadores metabólicos tempranos indicativos del desarrollo de la patología de Alzheimer. Conocer los mecanismos a través del cual se producen estos cambios metabólicos es necesario para establecer la vía de acción y la eficacia de estrategias terapéuticas como el uso del DCI como tratamiento para la pérdida de señalización de insulina y el desbalance metabólico.

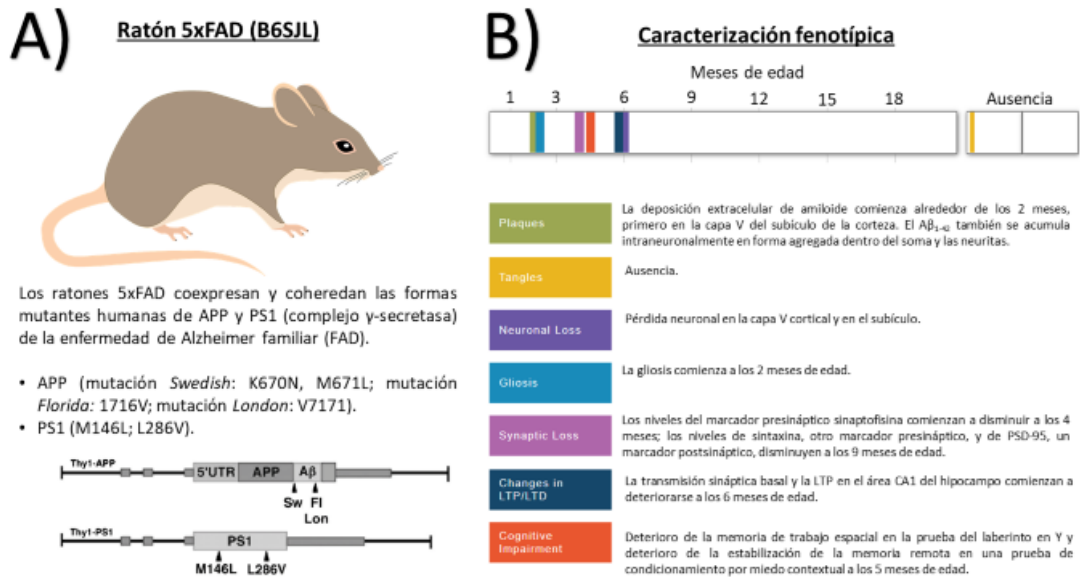
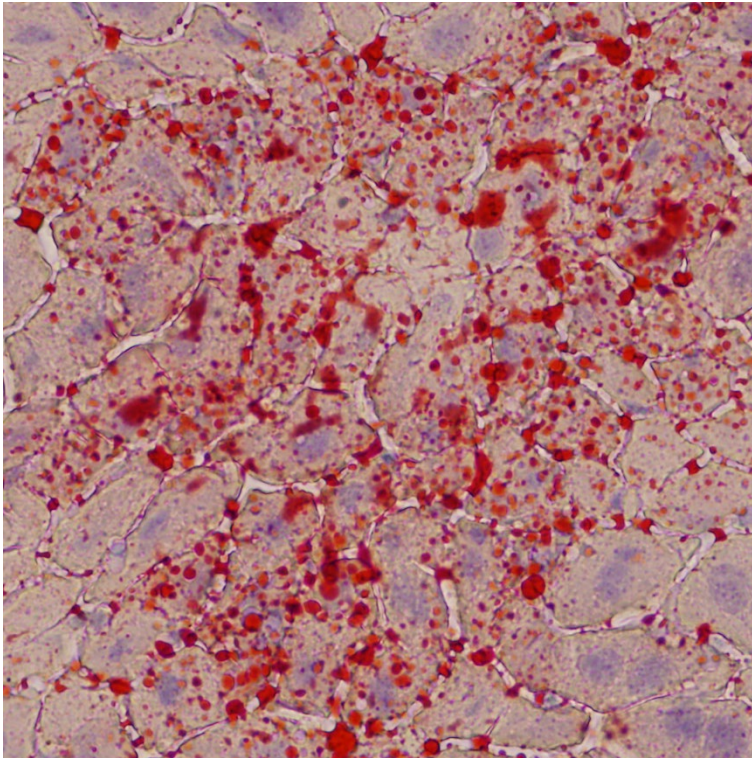


Figura 8. Descripción del modelo 5xFAD. A) Mutaciones asociadas al Alzheimer familiar introducidas bajo la acción del promotor Thy1. B). Caracterización del fenotipo del ratón 5xFAD y la aparición de las principales características celulares, moleculares y cognitivas. Adaptado de Oakley et al., 2006 (A); y de Alzforum. (n.d.), julio de 2022 (14).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Nuestro grupo de investigación de Neuropsicofarmacología del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), tiene una amplia experiencia multidisciplinar en el estudio de las bases biológicas del comportamiento y la fisiopatología de enfermedades degenerativas de gran prevalencia, incluyendo trastornos de alimentación, alteraciones endocrinas y la enfermedad de Alzheimer, a lo largo del desarrollo y en modelos de enfermedad y comorbilidad. Uno de los objetivos del grupo de investigación es la identificación de nuevos biomarcadores de enfermedad, el desarrollo de nuevas entidades químicas terapéuticas o nuevas indicaciones de fármacos existentes y la evaluación farmacológica de alimentos de uso médico especial (ADUME). La colaboración del grupo de investigación con empresas del tejido industrial biotecnológico en España para el desarrollo de nuevas terapias ha derivado en un amplio trabajo de investigación y actividad de transferencia a la salud, cuyos frutos se traducen en más de 15 patentes para el uso de nuevos fármacos en trastornos metabólicos y neurodegenerativos.

En base a los datos epidemiológicos, una de las propuestas del grupo es el uso del DCI para el tratamiento temprano de la EA, un compuesto de origen natural obtenido a partir de fuentes vegetales, que promueve la señalización de insulina, tiene propiedades antiinflamatorias y su uso actual comprende el tratamiento de patologías relacionadas con la resistencia a la insulina y síndrome metabólico. Este compuesto, el cual es incorporado a través de la dieta en alimentos como la soja, ha mostrado seguridad y carece de efectos secundarios en dosis agudas y crónicas en humanos, y existen evidencias preliminares que indican que podría prevenir el daño ocasionado por el péptido A β . Para evaluar la posible eficacia del DCI en el tratamiento de la EA y su eficacia a la hora de mitigar y retrasar los síntomas clínicamente relevantes de la EA, se hace necesario describir en profundidad cuáles son los mecanismos que derivan en una alteración de los parámetros metabólicos en la EA. Para ello, se ha realizado un trabajo de caracterización metabólica del modelo murino de EA, el ratón 5xFAD, el cual presenta 5 mutaciones humanas de sobreexpresión de *APP* y *PS1* y reproduce la patología amiloide y el deterioro cognitivo de forma similar a los humanos.

La **hipótesis general** de esta tesis doctoral es que las alteraciones metabólicas que se producen en el transcurso de la enfermedad de Alzheimer podrían influir en los procesos de neuroinflamación y neurodegeneración de la patología amiloide. Estos trastornos metabólicos podrían ser un marcador temprano de la propia enfermedad, siendo una diana efectiva para su tratamiento, por lo que es de gran importancia describir cuáles son los eventos celulares y moleculares que derivan de ellos. El uso del DCI, un compuesto natural que promueve la señalización de insulina y tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes podría suponer una alternativa terapéutica para aminorar el proceso de deterioro metabólico y cognitivo en la enfermedad de Alzheimer.

Por ello, el **objetivo principal** de este trabajo es el de caracterizar fisiológicamente los cambios metabólicos que se producen en durante el desarrollo del Alzheimer en un modelo humanizado de EA, el ratón 5xFAD. Con ello, identificar y describir dianas como la alteración del peso corporal, la pérdida de señalización de insulina y otros cambios hormonales y la caracterización de la patología en el hipotálamo, región encargada del control del balance energético, son un objetivo necesario para determinar la eficacia del tratamiento con DCI para aminorar el avance de la EA. Por ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Descripción del mecanismo de acción del DCI en la señalización de insulina, actividad antiinflamatoria y antioxidante y posibles dianas terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer.

- 1.1 Se realizará una revisión bibliográfica de todos los datos disponibles acerca de la actividad biológica del DCI y otros inositoles análogos, incluyendo datos de ensayos clínicos y patentes generadas para su uso en enfermedades neurodegenerativas y Alzheimer.
- 1.2 Se describirá la farmacodinámica y farmacocinética del DCI en un modelo de rata, en una administración subaguda, donde se determinará su efecto en sensibilizante de insulina en una prueba de tolerancia de glucosa y los niveles de metabolitos en plasma en un análisis bioquímico. Este trabajo se realizará en colaboración con la empresa Biotecnológica Euronutra S.L. en una estancia de investigación de un año.
- 1.3 Colaboración en el estudio del efecto de la administración de DCI y DPIN sobre las concentraciones plasmáticas de glucosa y hormonas que regulan la homeostasis de la glucosa (insulina, glucagón y grelina), y los efectos del DPIN sobre la concentración plasmática de hormonas hipofisarias (GH, prolactina, tirotropina (FSH), hormona luteinizante (LH) y FSH) en voluntarios humanos. Este trabajo se realizará en colaboración con la empresa Biotecnológica Euronutra S.L. en una estancia de investigación de un año.

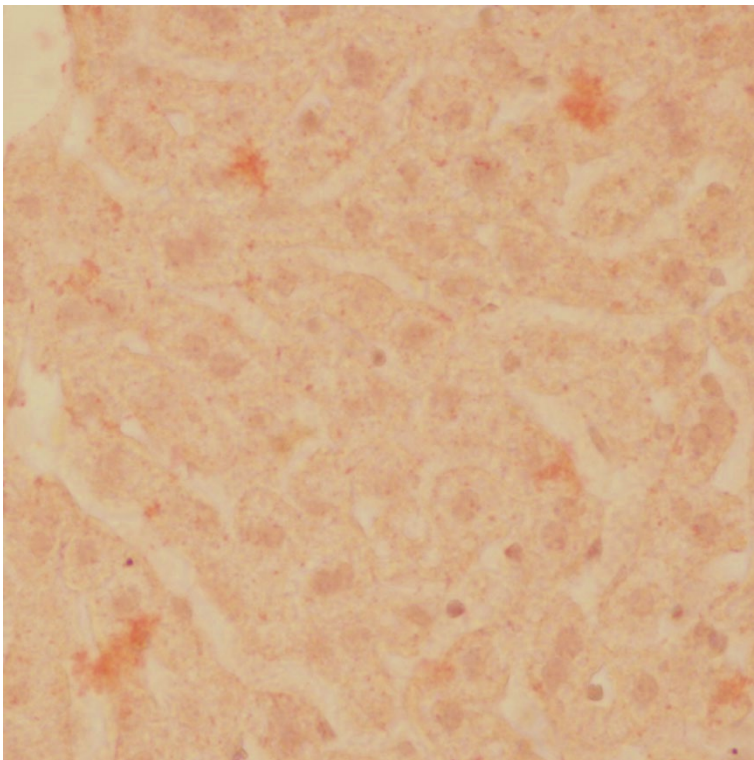
Objetivo 2. Caracterización del fenotipo de desregulación metabólica en un modelo de la enfermedad de Alzheimer, el ratón 5xFAD, en una edad inicial de 6 meses, en la cual se pueden observar indicios tempranos de deterioro cognitivo y patología amiloide.

- 2.1 Se compararán el fenotipo mutante homocigoto $Tg^{5xFAD/5xFAD}$ y el heterocigoto $Tg^{5xFAD/-}$ para determinar la penetrancia en el metabolismo de las mutaciones introducidas (las cuales tienen un efecto de dosis génica acumulativa para la producción de *APP* y *PS1*). También se usarán machos y hembras para determinar posibles diferencias en los parámetros auxológicos y metabólicos que sean debidos al sexo.
- 2.2 Se determinará si los animales 5xFAD presentan una alteración el peso corporal, además de cambios en el patrón de ingesta y el gasto energético mediante calorimetría indirecta, que expliquen el balance energético observado.
- 2.3 Se determinará la presencia o ausencia de placas en el hipotálamo de los animales 5xFAD mediante técnicas de inmunohistoquímica para descartar la patología amiloide en la región hipotalámica y se comparará con el hipocampo, región que ya han sido descritas que albergan placas de $A\beta$ en este modelo animal a 6 meses de edad. Se determinará también la presencia de respuesta inflamatoria en el hipotálamo mediante técnicas de biología molecular.
- 2.4 Se determinarán los niveles de hormonas metabólicas en plasma de los ratones 5xFAD y se medirá el estado de activación de los receptores hormonales y las rutas de señalización en el hipotálamo, estableciendo una relación entre la desregulación hormonal y el peso corporal de los ratones 5xFAD.

Objetivo 3. Estudio de la eficacia de la suplementación a través de la dieta de DCI durante 4 meses, desde los 6-7 meses hasta los 10-11 meses en animales 5xFAD homocigotos, machos y hembras, para revertir o paliar las alteraciones metabólicas y cognitivas sobre las dianas identificadas en el modelo 5xFAD. Se observarán además alteraciones metabólicas adicionales puedan producirse en el transcurso de la edad y el envejecimiento de los ratones.

- 3.1 Se determinará el efecto del DCI sobre los parámetros de auxológicos de peso corporal patrón de ingesta y el gasto energético mediante calorimetría indirecta. Se valorará también el efecto del DCI en el deterioro cognitivo de los ratones 5xFAD mediante tests de comportamiento de memoria de trabajo corto-plazo y memoria de aprendizaje.
- 3.2 Se evaluará la eficacia del DCI en el restablecimiento de la señalización normal de insulina y los parámetros hormonales alterados en el ratón 5xFAD y el impacto de éstos en el fenotipo de desregulación metabólica diferencial entre machos y hembras.
- 3.3 Se determinará la capacidad antiinflamatoria del DCI en el hipotálamo y el efecto sobre los niveles alterados de neuropéptidos hipotalámicos que controlan el balance energético.
- 3.4 Se evaluará la capacidad hepatoprotectora del DCI en la patología de acumulación de ácidos grasos específica de hembras 5xFAD asociada a la acumulación de A β y cambios hormonales.
- 3.5 Se determinará la capacidad del DCI a la hora de revertir la pérdida de masa ósea específica de hembras 5xFAD asociada a cambios hormonales y un envejecimiento prematuro y menopausia.

4. METODOLOGÍA



La metodología empleada en este trabajo de Tesis Doctoral se encuentra recogida en los artículos publicados disponibles en los ANEXOS. A continuación, se resume la metodología empleada y se proporciona una descripción detallada de los procedimientos utilizados en los resultados complementarios no incluidos en los artículos.

4.1 Animales y tratamiento

Los animales utilizados serán: ratas wistar y ratones macho y hembra transgénicos tipo 5xFAD en heterocigosis ($Tg^{5xFAD/-}$) y homocigosis ($Tg^{5xFAD/5xFAD}$, también simplificados como 5xFAD), así como sus hermanos de camada no transgénicos como controles (Non-Tg). El modelo de ratón transgénico 5xFAD contiene 5 mutaciones frecuentes en la enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) Los ratones 5xFAD co-expresan y co-heredan formas mutantes de la enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) de transgenes humanos para APP (la mutación *Swedish*: K670N, M671L; la mutación *Florida*: 1716 V; la mutación *London*: V7171) y PS1 (M146L; L286V) bajo el control transcripcional del promotor Thy-1 de ratón específico de neuronas (línea Tg6799) (14). Las líneas 5xFAD (fondo genético B6/SJL) se mantuvieron cruzando ratones transgénicos heterocigotos de primera generación (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Los ratones de camada de tipo salvaje Non-Tg sirvieron de control, dada la ausencia de deposición de A β en el cerebro a los 6 meses de edad (distintivo de los ratones 5xFAD) y la falta de deterioro cognitivo y desequilibrios metabólicos. Todos los modelos animales fueron alojados en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga. Se empleó una dieta estándar para roedor (STD, 2.9 kcal/g). Se suplementó el compuesto D-Chiro-inositol, suministrado por la empresa biotecnológica Euronutra S.L. (<https://www.euronutra.com/>) en forma de polvo fino cristalino. Para el modelo 5xFAD, el compuesto fue disuelto en agua y administrado *ad libitum* vía oral a una concentración de 200 mg/kg, basada en datos preliminares, desde los 6 a los 10 meses de edad para evaluar el declive metabólico y cognitivo en animales de mediana edad. El DCI se administró vía *gavage* a las ratas Wistar a una concentración de 100 mg/kg durante 10 días en un estudio subagudo.

4.2 Análisis fisiológico, metabólico y de comportamiento

Durante el período de 6 a 10 meses de edad, evaluamos semanalmente el peso corporal de los machos y hembras 5xFAD. También evaluamos la ingesta diaria de alimentos, el gasto energético, coeficiente respiratorio. y actividad locomotora (calorimetría indirecta Oxilet de Panlab) a los 6 y 10 meses de edad. Todos los animales fueron utilizados para las pruebas de comportamiento a edad basal y durante el tratamiento:

- *Novel object recognition* (NOR), para analizar la actividad (locomoción), ansiedad y memoria a largo plazo. Evaluado a los 6 meses de edad (antes del tratamiento con DCI).
- *Y-maze* (YM), para analizar la memoria a corto plazo. Evaluado a los 6 y 8 meses de edad (antes y durante el tratamiento con DCI).
- *Elevated-plus maze* (EPM), para analizar la ansiedad desde otro parámetro. Evaluado a los 6 meses de edad (antes del tratamiento con DCI).

- *Morris water maze* (MWM), para analizar la memoria de trabajo, la memoria a corto, largo plazo y la plasticidad para crear nuevos recuerdos. Evaluado a los 8 meses de edad (durante el tratamiento con DCI).

Se puede encontrar un resumen del diseño experimental referente al tercer trabajo publicado en la **Figura 9**.

Diseño experimental:

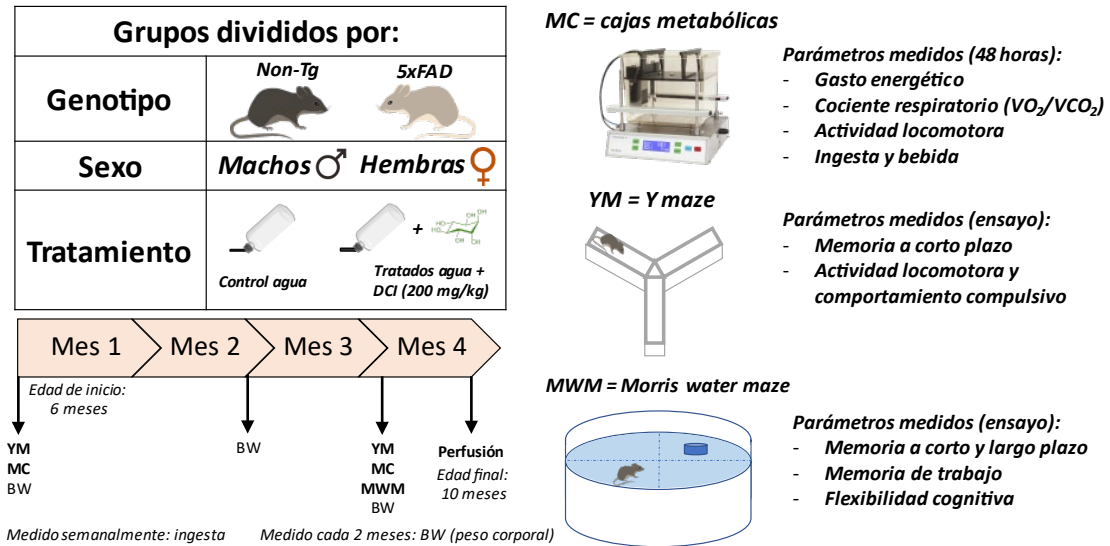


Figura 9. Esquema de trabajo con los ratones 5xFAD tratados con D-Chiro inositol (DCI) a una dosis de 200 mg/kg (disuelto en agua *ad libitum*). A una edad inicial de 6, se realizan las pruebas de comportamiento de laberinto en Y (Y-Maze (YM)) para determinar cambios en la memoria a corto plazo. Al mismo tiempo, se determinan los parámetros de ingesta, gasto calórico y actividad a nivel basal en las cajas metabólicas (MC). De forma semanal se determina la ingesta acumulativa en Kcal de los ratones, y se determina el peso corporal cada dos meses. Previamente a su sacrificio tras 4 meses de tratamiento a los 10 meses de edad, se vuelven a realizar las pruebas de comportamiento del laberinto en Y, cajas metabólicas, así como el laberinto acuático de Morris (*Morris water maze* (MWM)), donde se determinan los parámetros de memoria a corto y largo plazo, memoria de trabajo y flexibilidad cognitiva.

4.3 Análisis molecular e histológico

Todos los animales del estudio 5xFAD fueron sacrificados a los 10 meses de edad con pentobarbital sódico (150 mg/kg, intraperitoneal). Se les extrajo sangre directamente de la aurícula derecha.

- Se obtuvieron muestra para histología del hemisferio izquierdo del cerebro, duodeno, yeyuno/íleon, colon e hígado. También se obtuvieron muestras para análisis bioquímico del hemisferio derecho del cerebro, duodeno, yeyuno/íleon, colon, hígado, páncreas, grasa blanca, músculo gastrocnemio, tibias, fémures y heces.
- Se analizaron los niveles específicos de proteínas mediante western blot, determinando la expresión de proteínas relacionadas con inflamación, estrés oxidativo, metabolismo lipídico, ruta de señalización de insulina, leptina, GSK-3 β y Tau.
- Se evaluó la presencia de A β , GFAP e IBA1 mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia a los 6 y 10 meses de edad en secciones hipocámpales e hipotalámicas (30 μ m) cortadas con un criostato. Se seleccionaron secciones coronales

de flotación libre que contenían el hipotálamo y el hipocampo de ratón de - 1,22 a - 1,94 mm de niveles de bregma.

- Se determinó la expresión de los neuropéptidos específicos encargados del control de la ingesta y actividad circadiana en el hipotálamo mediante qPCR.
- Se determinaron los niveles basales de un panel de hormonas reguladoras del balance energético mediante un sistema de ELISA-multiplex (basado en tecnología con bolas magnéticas): insulina, leptina, glucagón, grelina, GLP-1, resistina, GIP y PAI-1.
- Se realizó un análisis de parámetros bioquímicos en plasma (glucosa, ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol, creatinina, urea, ácido úrico y transaminasas) para determinar un posible daño hepático que pueda afectar al metabolismo del animal.
- El contenido de grasa en el hígado se determinó mediante la extracción de ácidos grasos totales. Las muestras del lóbulo lateral izquierdo del hígado se cortaron en secciones de 5 μ m de espesor. La morfología del hígado se evaluó con la tinción de hematoxilina-eosina, y la presencia de depósitos amiloides se determinó mediante la tinción con rojo Congo.
- El análisis morfométrico y de porosidad del hueso trabecular y cortical de los fémures de ratones 5xFAD tratados con DCI a los 10 meses de edad se evaluó mediante tomografía micro-computerizada (micro-CT).

4.4 Tinción con rojo Congo de secciones del hígado

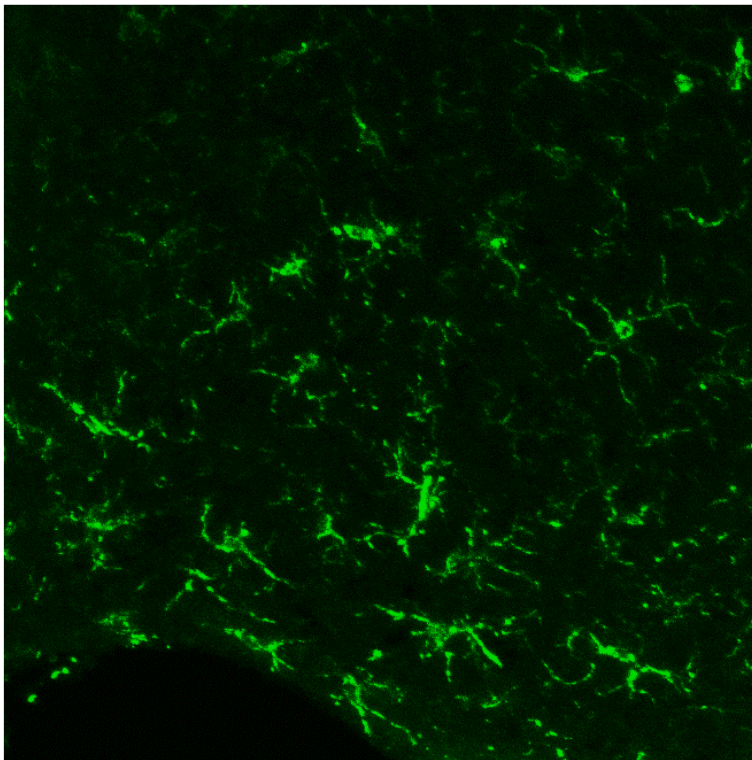
Se procesaron muestras del lóbulo medio del hígado posfijadas en paraformaldehído al 4% durante 48h e incrustadas en parafina. Los bloques de parafina se seccionaron cortes 5 μ m de grosor utilizando un microtomo de parafina. Posteriormente, las secciones se desparafinaron y rehidrataron mediante una serie de baños de xileno y alcohol, y se tiñeron con hematoxilina utilizando un procedimiento estándar durante 5 minutos. Posteriormente, se incluyeron los cortes en alcohol al 95% y se tiñeron con rojo Congo (Sigma-Aldrich #HT-60, St. Louis, MO, EEUU) durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras fueron incluidas brevemente en alcohol al 100% y se montaron en montaje acuoso.

4.5 Evaluación de los parámetros auxológicos y análisis morfométrico y de porosidad del hueso trabecular y cortical de los fémures

El fémur de los ratones 5xFAD fue extraído y conservado en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. La longitud del fémur se determinó con un calibrador. El análisis morfométrico de la microarquitectura y porosidad del fémur de los ratones 5xFAD se realizó mediante micro-CT, realizado en la Unidad de Difracción de rayos X de los laboratorios de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga. La muestra no se sometió a

ningún tratamiento previo a la medida por micro-CT y se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes y después de la medida de micro-CT. Los datos se registraron empleando el equipo SKYSCAN 2214 (Bruker) con filamento de W, filtro de $0,25\text{ mm}$ de Al y cámara CCD3. La muestra se encuentra a $126,710\text{ mm}$ de la fuente, con una distancia fuente-detector de $315,449\text{ mm}$. La medida se realizó empleando 45 kV y 130 mA . El tamaño de vóxel es de $7\text{ }\mu\text{m}$. El tiempo de exposición fue de $2,6$ segundos y el tamaño de rotación de $0,35^{\circ}$. A partir de la medida de micro-CT se obtuvieron una serie de proyecciones, las cuales se emplearon para la reconstrucción de la muestra en 3D. La reconstrucción se llevó a cabo empleando *post-alignment*, para reducir el movimiento de la muestra, y 40% de corrección de *beam hardening*. Posteriormente se realizó el análisis morfométrico y de porosidad del hueso trabecular y cortical de los fémures de ratón, determinando los parámetros más importantes para el análisis de la microarquitectura ósea (351). Se calcularon los siguientes parámetros morfológicos del hueso trabecular: fracción de volumen óseo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N), separación de trabéculas (Tb.Sp) y grosor trabecular (Tb.Th). También se calcularon los siguientes parámetros morfológicos del hueso cortical: grosor cortical medio (St.Th), área de la sección total (Tt.Ar), área de hueso cortical (Ct.Ar) y porcentaje de volumen de objeto (Obj. V/TV).

5. RESUMEN DE RESULTADOS



En este trabajo de tesis doctoral se ha realizado una caracterización de aquellos parámetros relacionados con el metabolismo, señalización endocrina y balance energético que se encuentran alterados en el ratón 5xFAD, un modelo murino que genera una acumulación de A β secuencial en el cerebro similar a la observada en humanos y que reproduce aquellos rasgos patológicos asociados como la distrofia sináptica, respuesta inmune y neuroinflamatoria y muerte neuronal. Los estudios epidemiológicos cada vez señalan que ocurren cambios a nivel fisiológico en un estadio prodrómico o temprano de la EA, los cuales son indicativos del desarrollo de la enfermedad. Problemas en la ingesta, alteraciones en el control del gasto energético y el balance de energía que conllevan a una pérdida de peso, bajos niveles de insulina, alteraciones hormonales propias de un envejecimiento prematuro e indicios de una desregulación metabólicas en la periferia han sido descritos a lo largo de los años en pacientes de EA. No obstante, aún se desconocen los eventos a nivel molecular y celular que desencadenan estos mecanismos. Además, aún no está clara la interrelación de estos problemas. Estas alteraciones metabólicas suponen una posible diana para una intervención terapéutica temprana. Una de las propuestas de este grupo es el uso del DCI, un compuesto natural de origen vegetal y obtenido a través de la dieta, el cual interactúa con varias de las dianas propuesta, ya que promueve la señalización de insulina en el organismo, ejerce mecanismos hepatoprotectores y posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes. Su vía de administración oral, la seguridad de su uso y su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica lo convierten en un candidato ideal como tratamiento para frenar el desarrollo de la EA. A continuación, se exponen de forma un resumen de los resultados obtenidos durante el período de trabajo de esta tesis doctoral, incluyendo resultados preliminares y aquellos resultados de la investigación relevantes que no forman parte de las publicaciones.

5.1 Estudio de farmacodinámica del DCI en un modelo de rata Wistar (resultados preliminares no publicados)

Dado lo anteriormente expuesto, durante el período de tesis doctoral se ha evaluado el mecanismo de acción del DCI y su potencial uso en la EA. Se realizó un estudio preliminar de farmacodinámica de la administración subaguda oral de DCI en una dosis de 100 mg/kg en ratas Wistar macho durante 10 días. para determinar su capacidad de promover la señalización de la insulina en una prueba de tolerancia de glucosa (*glucosa tolerance test* (GTT)) y se analizó su efecto en los parámetros de un análisis bioquímico, demostrando una seguridad en su uso.

En el análisis de parámetros bioquímicos, no se observan alteraciones en los niveles de glucosa en ayunas, ni tampoco elevación de las enzimas hepáticas transaminasa transaminasa glutámico-oxalacética (*glutamic oxaloacetic transaminase* (GOT/AST)) y transaminasa glutámico-pirúvica (*glutamate pyruvate transaminase* (GPT/ALT)), así como tampoco de creatinina, urea o ácido úrico, lo cual sugiere que el DCI no tiene un efecto tóxico sobre el hígado o riñones (**Figura 10 A-C; J-L**). Las ratas tratadas con DCI manifestaron un aumento de los niveles de la lipoproteína de alta densidad del colesterol (*high density lipoprotein* (HDL)), y una disminución de los niveles de la lipoproteína de baja densidad de colesterol (*low density lipoprotein* (LDL)), resultando en una mejora del perfil lipídico en plasma (**Figura 10 F, G**). Se observó, además un aumento de la bilirrubina plasmática no asociada a parámetros de hepatotoxicidad como la urea o las enzimas transaminasas, por lo que este resultado sugiere que el DCI promueve la liberación de bilirrubina, la cual es una molécula con una potente

actividad antioxidante en el organismo (Figura 1 I) (352). La prueba de tolerancia de la glucosa mostró un efecto significativo del DCI disminuyendo los niveles de glucosa entre los 5 y los 60 minutos después del bolo de glucosa respecto al grupo control, lo que reafirma muestra que el DCI es capaz de promover la liberación y la señalización de insulina cuando es administrado de forma continuada (Figura R1 M).

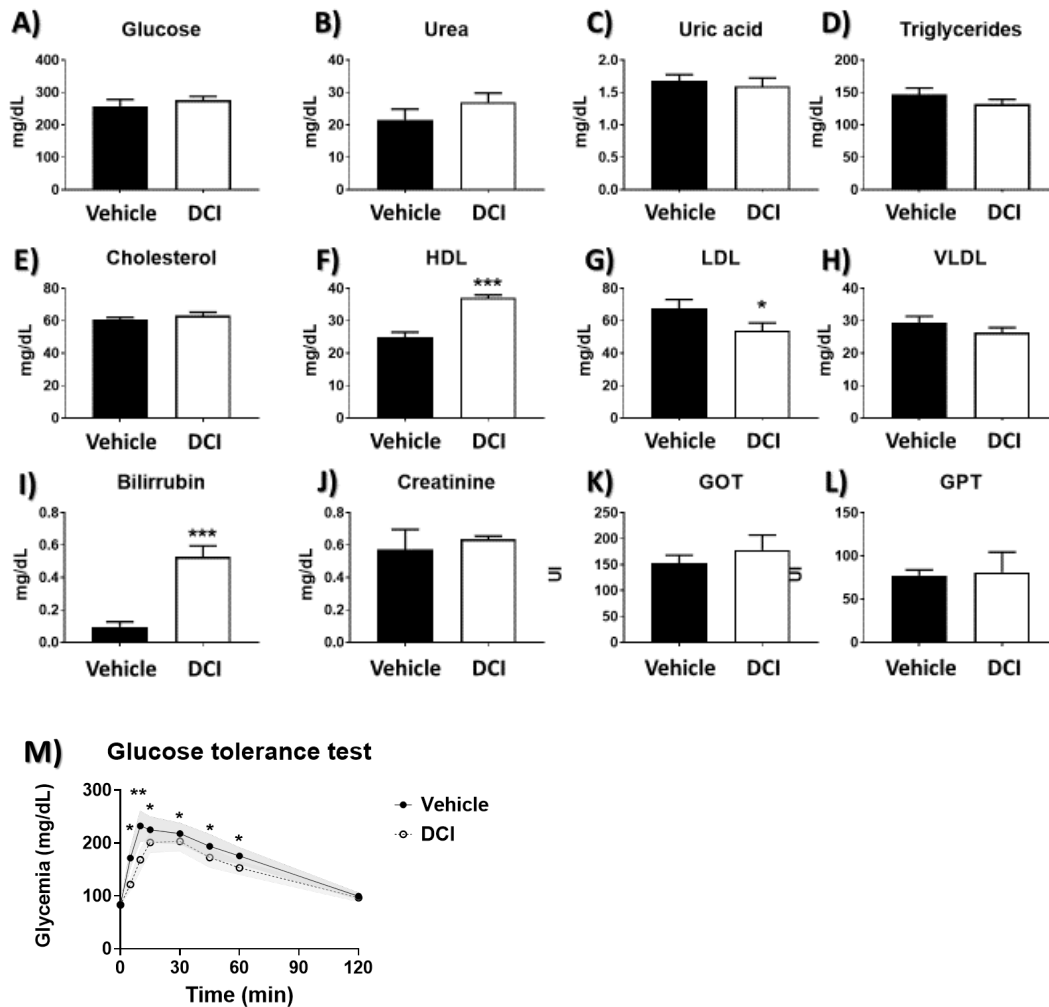


Figura 10. A-L) Análisis bioquímico en plasma de ratas Wistar tratadas con DCI durante 10 días. M) Test de tolerancia a la glucosa realizado al décimo día de tratamiento. Prueba T de student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. GOT – transaminasa glutámico-oxalacética; GPT – transaminasa glutámico-pirúvica; HDL – lipoproteína de alta densidad; LDL – lipoproteína de baja densidad; VLDL – lipoproteína de muy baja densidad.

5.2 Caracterización del mecanismo de señalización del DCI y uso como tratamiento en la enfermedad de Alzheimer (primer artículo publicado, año 2020)

Posteriormente, se realizó una revisión bibliográfica acerca del papel del DCI en la ruta de la señalización de la insulina, y se describieron los mecanismos a través de los cuales el DCI interviene en procesos de inflamación, estrés oxidativo y disfunción endotelial, identificando además potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de la EA. El DCI forma parte de la familia de los inositoles, polialcoholes alicíclicos de 6 carbonos y estructura similar al azúcar, presentes tanto en los fluidos celulares como en los fosfolípidos y glicanos de las membranas plasmáticas, bien incorporados en GPIs (elementos de la hoja externa de la membrana plasmática que pueden servir como anclaje de proteínas) o fosfatidilinositoles (PIs) (responsables del tráfico de membrana y señalización intracelular). Los inositoles participan en múltiples funciones fisiológicas (89, 90). Los inositoles pueden ser incorporados a través de la dieta (89), o sintetizados por el organismo. El DCI puede ser obtenido se su análogo myo-inositol a través de la acción de una epimerasa (91, 92). El DCI también puede ser obtenido a través de la desmetilación ácida producida en el estómago de su análogo 3-O-metilado, el DPIN, el cual se encuentra en grandes cantidades en productos como la soja y el trigo.

El DCI presenta algunas actividades similares a las de la insulina, como la estimulación de la lipogénesis, el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno (80) y las alteraciones del metabolismo del inositol desempeñan un papel importante en las enfermedades que implican resistencia a la insulina, como la diabetes y el síndrome de ovario poliquístico (353). En esta revisión se ha propuesto un mecanismo por el cual el DCI participa y promueve la ruta de señalización de insulina en la vía no canónica. En el modelo propuesto, la señalización de insulina a través de una proteína proteína G_q estimula la glicofosfatidilinositol fosfolipasa D (GPI-PLD), mediando la hidrólisis del enlace fosfato entre el inositol en forma de GIP y los lípidos de la membrana, lo que conduce a la liberación de inositol fosfoglicanos (IPG), los cuales son internalizados a través de un transportador de membrana. Los IPG también pueden median la activación de IRS1 e IRS2, segundos mensajeros de la señalización de insulina, a través de la activación de la proteína quinasa $pp59^{Lyn}$, mientras que otras dianas de los inositoles definidas específicamente para DCI son la modulación alostérica de la proteína fosfatasa 2C (*protein phosphatase 2C* (PP2C)) y la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (*pyruvate dehydrogenase phosphatase* (PDHP)), así como estimular directamente en ausencia de la insulina a segundos mensajeros de su señalización como PI3K, Akt, o inhibir AMPK (354-356). El DCI, además, es capaz de promover la liberación de insulina en un mecanismo similar al producido por la glucosa en las células β -pancreáticas (81-83).

Además de promover la señalización de insulina, se ha observado que los inositoles como el DCI o su análogo DPIN, promueven la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (*superoxide dismutase* (SOD)), glutatión peroxidasa (*glutathione peroxidase* (GPx)) y glutatión-S-transferasa (*glutathione-S-transferase* (GST)), además de disminuir la respuesta inflamatoria y los niveles de citoquinas como TNF- α o IL-1 β (93-98). En general, el DCI y su análogo DPIN han demostrado ser herramientas farmacológicas potenciales por sus efectos positivos en diferentes patologías: anticancerígeno (97), antidiabético (99), antioxidante (98), hepatoprotector (85, 100), inmunosupresor (101), antiosteoporosis (102, 103), antienvjecimiento (105) y trastornos cerebrales asociados a la resistencia a la insulina, como la enfermedad de Alzheimer (EA) (1, 87, 104).

En base su capacidad moduladora de la señalización de la insulina se ha observado que el DCI es capaz de reducir la toxicidad de los oligómeros solubles de A β y su unión a la membrana en neuronas hipocampales *in vitro*, disminuyendo su unión a la membrana lipídica y evitando la formación de neuritas distróficas. Otros estudios recientes han sugerido que el DPIN, análogo de DCI, es capaz de disminuir el procesamiento de APP por la γ -secretasa y la formación de A β , dejando intacto el mecanismo de procesamiento de notch, por lo que sugiere que podría modular de forma parcial la vía amiloidogénica de producción de A β . No obstante, el mecanismo a través del cual se produce este efecto es aún desconocido. La capacidad del DCI de promover la señalización de insulina además de su capacidad antiinflamatoria y antioxidante lo posicionan como un tratamiento prometedor para la EA. La presencia de alteraciones metabólicas en pacientes con EA que podrían estar asociadas a una pérdida de señalización de insulina constituyen una diana farmacológica potencial para el uso del DCI, de forma que es esencial descubrir cómo se producen a nivel celular y molecular estos mecanismos para evaluar la eficacia de un posible tratamiento con el DCI. Este estudio constituye el primer artículo publicado del compendio de esta tesis doctoral.

5.3 Caracterización del fenotipo de desregulación metabólica en el modelo 5xFAD de la enfermedad de Alzheimer (segundo artículo publicado, año 2021)

Tras el primer trabajo publicado en el siguiente estudio se determinaron cuáles son los mecanismos asociados a un desequilibrio de la homeostasis de energía en estadios tempranos de la manifestación de síntomas cognitivos, como posibles dianas para un tratamiento con DCI. Por tanto, se caracterizó el fenotipo de desregulación metabólica en un modelo de la enfermedad de Alzheimer, el ratón 5xFAD, utilizando tanto machos como hembras homocigotas para las mutaciones (Tg^{5xFAD/5xFAD}) como heterocigotos (Tg^{5xFAD/-}), en una edad inicial de 6 meses, en la cual se pueden observar indicios tempranos de deterioro cognitivo y patología amiloide.

De estos resultados, se puede discernir que los ratones Tg^{5xFAD/-} y Tg^{5xFAD/5xFAD} presentan una pérdida de peso, que se encuentra relacionada principalmente con una menor ingesta, la cual es compensada parcialmente por una disminución del gasto energético en un mecanismo de adaptación del organismo según indican los datos obtenidos en cajas metabólicas. En un estudio de inmunohistoquímica se observó que el hipotálamo, centro regulador del balance energético y de los procesos de ingesta y tasa metabólica, no presentaba acumulación de placas de A β . Mediante las técnicas de western blot y qPCR, se ha determinado que existe, no obstante, una activación de la población glial y una respuesta inflamatoria en el hipotálamo de los animales 5xFAD, que se muestra con mayores niveles totales de GFAP (reactividad astrocítica), IBA1 (activación de la microglía), IL-1 β o TNF- α . Estos resultados sugieren que la respuesta inflamatoria en el hipotálamo podría estar asociada a la presencia de oligómeros solubles de A β no detectables en inmunohistoquímica y/o, a otros procesos metabólicos. En un análisis de correlación, se mostró que el proceso inflamatorio estaba relacionado con el menor peso corporal específicamente en las hembras Tg^{5xFAD/-} y Tg^{5xFAD/5xFAD}.

Puesto que la resistencia a la insulina cerebral es un patrón observado en modelos de ratones con EA y se ha observado la expresión de A β en otras regiones periféricas como el páncreas y el tracto gastrointestinal (296, 357), quisimos determinar si una posible alteración de los niveles plasmáticos de insulina, adipoquinas (leptina, resistina) u hormonas que intervienen en la

secreción de insulina (GIP, GLP-1, grelina) podría estar relacionada con una respuesta deficiente del hipotálamo, cuyo proceso inflamatorio podría además exacerbar una respuesta deficiente a estas hormonas reflejando un mal manejo del balance energético y la pérdida de peso. Se determinó mediante un ensayo de ELISA multiplex que los animales 5xFAD presentaba menores niveles hormonales de insulina, grelina, GLP-1 y GIP, así como una desregulación en la señalización de insulina y leptina en el hipotálamo. Esto se vio reflejado en los cambios encontrados en el patrón de ingesta y gasto metabólico, existiendo una correlación entre niveles menores en plasma de insulina, GIP y GLP-1 con un menor peso corporal en los ratones $Tg^{5xFAD/-}$ y $Tg^{5xFAD/5xFAD}$. Además, los animales transgénicos presentaban menores niveles de expresión de los neuropéptidos orexígenos *Npy* y *Agrp*, así como niveles alterados de los neuropéptidos orexina (*Pmch*) y *Mch*, los cuales se encargan de determinar los patrones de actividad e ingesta durante el día y la noche.

Existen estudios poblacionales que relacionan alteraciones en el perfil lipídico en plasma y los niveles de colesterol y triglicéridos con el riesgo de EA (358), por lo que realizamos un análisis de bioquímica, en el que se encontró que los animales $Tg^{5xFAD/5xFAD}$ presentaban alteraciones en los niveles de colesterol LDL y HDL, con un dimorfismo sexual siendo estas alteraciones más significativas en las hembras. Además, se observan niveles elevados de la transaminasa hepática GOT, indicando una posible alteración de la función hepática. Dado que el hígado es el órgano encargado de la eliminación de los péptidos A β en la periferia, un posible daño hepático podría contribuir al fenotipo de deterioro cognitivo. Estos resultados pueden verse resumidos en un esquema (**Figura 11**), y constituyen la base para el desarrollo del tercer artículo publicado en el compendio de esta tesis doctoral.

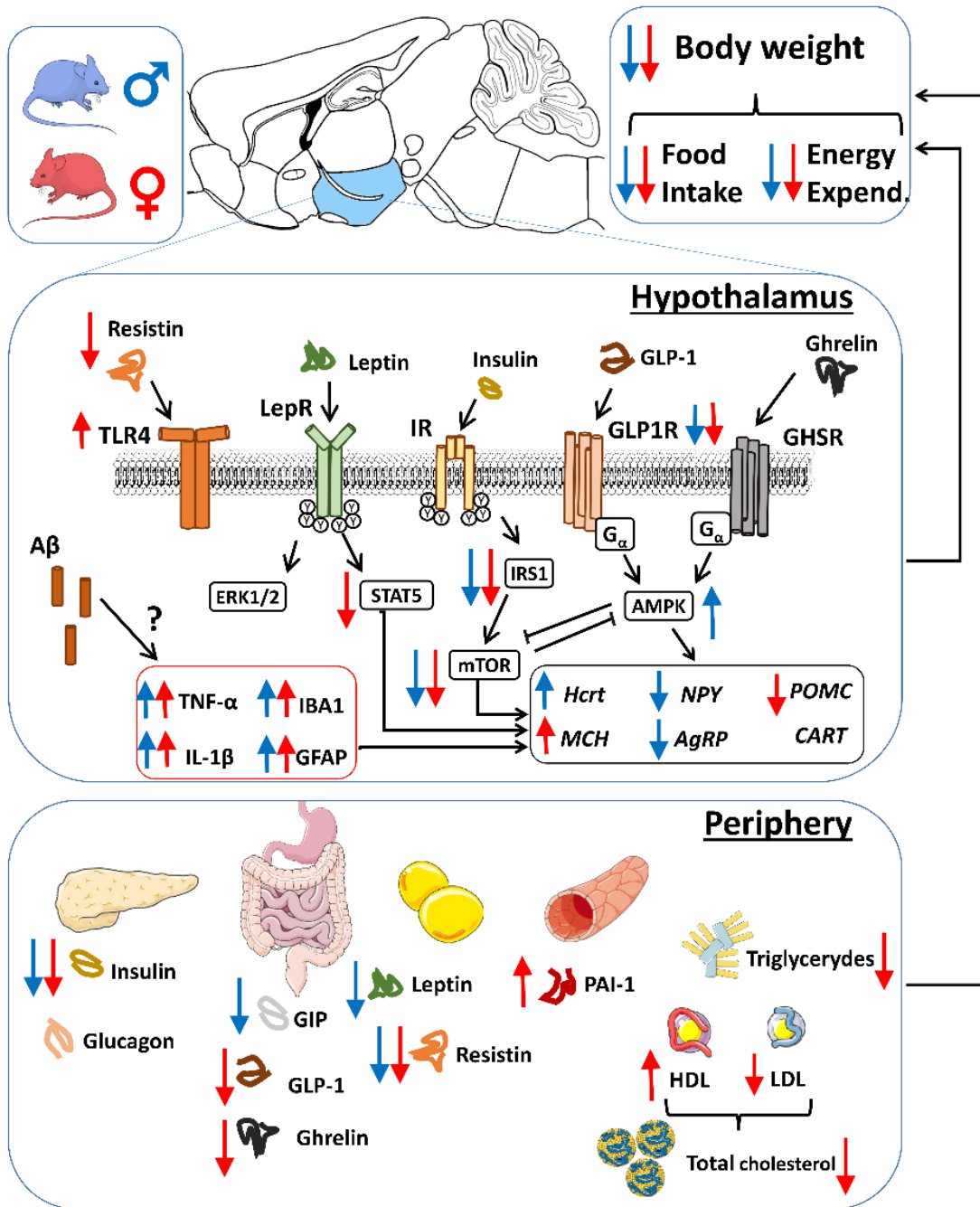


Figura 11. Resumen de las alteraciones periféricas e hipotalámicas derivadas del balance energético negativo y la disminución del peso corporal en los ratones 5xFAD. Los niveles aumentados o disminuidos se representan en azul para los machos y en rojo para las hembras. En la periferia, la disminución de insulina en plasma está asociada a la disminución del GIP y GLP-1, relacionados con el patrón de disminución del peso corporal. Las hembras también mostraron niveles más bajos de triglicéridos y de colesterol, con un aumento de HDL y una disminución de LDL. En el hipotálamo, la señalización de la insulina y leptina estaba disminuida en los ratones 5xFAD, así como los niveles hipotalámicos de resistina en las hembras. A pesar de la ausencia de placas amiloides, se detectó neuroinflamación hipotalámica que contribuye a la pérdida de peso. A β – β -amiloide; AgRP – proteína relacionada con aguti; AMPK - proteína quinasa activada por 5' AMP; CART – transcrito regulado por cocaína y anfetamina; ERK - quinasa regulada por señales extracelulares; GFAP – proteína ácida fibrilar; GHSR – receptor de grelina; GIP – polipéptido inhibitor gástrico; GLP-1 – péptido similar a glucagón 1; GLP1R – receptor de GLP-1; Hcrt – orexina; HDL – lipoproteína de baja densidad; IBA1 – molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1; IL-1 β – interleuquina 1 β ; LDL – lipoproteína de alta densidad; IR – receptor de insulina; IRS1 – sustrato del receptor de insulina 1; LepR – receptor de leptina; MCH – hormona concentradora de melanina; mTOR – diana de la rapamicina en mamíferos; NPY – neuropéptido Y; PAI-1 – activador de plasminógeno 1; POMC – proopiomelanocortina; STAT5 - transductor de señales y activador transcripcional 5; TLR4 – receptor de tipo toll 4; TNF- α – factor de necrosis tumoral α . Tomado de López-Gambero et al., 2021 (263).

5.4 Estudio de la eficacia de la suplementación de DCI sobre las alteraciones metabólicas y cognitivas identificadas en el modelo 5xFAD de enfermedad de Alzheimer (tercer artículo publicado, año 2022)

La caracterización de los mecanismos celulares y moleculares que derivan en un fenotipo de desregulación metabólica de los ratones 5xFAD permitió definir aquellas dianas susceptibles de ser evaluadas con un tratamiento de DCI. Por tanto, posteriormente se evaluó la capacidad del DCI de revertir el balance energético negativo actuando sobre la ruta de señalización de la insulina, inflamación hipotalámica y la patología hepática, la cual fue detectada en edades más avanzadas en hembras 5xFAD. Se definió un tratamiento de DCI administrado oralmente en el agua de bebida a una dosis de 200 mg/kg (150 mg/L, con un consumo medio de 4 mL diarios en un ratón de 30g de peso), en animales machos y hembras homocigotos (ahora llamados simplemente 5xFAD), durante 4 meses, desde los 6 a los 10 meses de edad.

En el seguimiento auxológico de los animales 5xFAD tratados con DCI desde los 6 a los 10 meses de edad, se observó una pérdida de peso progresiva de los ratones 5xFAD comparados con sus hermanos de camada no transgénicos. El tratamiento con DCI en los animales machos y hembras 5xFAD homocigotos durante 4 meses evitó la pérdida de peso hasta los 10 meses de edad, gracias a un aumento de la ingesta, lo cual se vio reflejado a su vez en un incremento del gasto energético, recogido en las mediciones de oximetría de cajas metabólicas. Además de normalizar el déficit metabólico, se observó que el tratamiento con DCI frenó el avance del deterioro cognitivo en procesos de memoria a corto plazo, como se observa a los 2 meses de tratamiento en la prueba de laberinto en Y (*Y-maze* (YM)), con una mayor alternancia de entradas a los brazos correcta, así como la flexibilidad cognitiva determinada en la prueba del laberinto acuático de Morris (*Morris wáter maze* (MWM)).

En base a la alteración de la secreción de hormonas mostrada a 6 meses de edad por los ratones 5xFAD, se evaluó el efecto del DCI sobre los niveles de hormonas metabólicas, así como de aquellas hormonas generadas en la hipófisis, como la GH, FSH o LH, siendo éstas últimas indicativas del estado de las hormonas sexuales en plasma y del envejecimiento metabólico. En general, la administración de DCI restableció los valores normales en plasma de insulina, GIP y GLP-1 (los cuales se encuentran disminuidos en los 5xFAD), además de restaurar a niveles normales la FSH anormalmente elevada en hembras 5xFAD, indicativa de menopausia asociada a un envejecimiento prematuro, así como de BDNF factor trófico cuyos niveles aumentados se encuentran asociados a un estadio temprano de deterioro cognitivo asociado a una respuesta inflamatoria. A nivel hipotalámico, el DCI fue capaz de revertir la expresión incrementada de genes inflamatorios como *Tnf* o *Il1b*, así como de *Gfap* (también disminuyendo la inmunorreactividad de astrocitos observada por inmunofluorescencia). Esta inflamación hipotalámica estaba asociada, a su vez, a una disminución de la expresión de neuropéptidos como *Npy* y *Agrp*, que a su vez estaban relacionados con la menor ingesta, la pérdida de peso y niveles bajos de insulina y sus secretagogos en plasma.

Uno de los órganos periféricos encargados de eliminar A β es el hígado y existen estudios que relacionan el daño hepático con niveles elevados de A β . Tras observar indicios de daño hepático en las hembras 5xFAD a 6 meses de edad, lo cual podría influir en la patología amiloide, se determinó el estado metabólico del hígado a través del análisis de contenido graso mediante la extracción de ácidos grasos total, además de determinar la expresión de genes involucrados en

las rutas lipogénesis, lipólisis, respuesta inflamatoria y estrés oxidativo. Se observó que las hembras 5xFAD mostraban una acumulación de ácidos grasos anómala en el hígado, a pesar de un menor peso corporal, y un aumento de la expresión génica de factores implicados en la lipogénesis y β -oxidación de ácidos grasos, evidenciando una respuesta a la acumulación de ácidos grasos hepática. Esto se veía acompañado de unos niveles elevados en plasma de las enzimas hepáticas GOT y GPT, cuyo incremento indica un posible daño hepático. El tratamiento con DCI mostró una disminución significativa de la acumulación de ácidos grasos en el hígado de las hembras 5xFAD, evidenciando un efecto hepatoprotector.

Estos resultados avalan la eficacia del DCI como tratamiento nutracéutico que previene el declive metabólico y cognitivo en un modelo animal de Alzheimer. El DCI restaura la pérdida de señalización de insulina, disminuye la inflamación mostrada en el hipotálamo restaurando el balance energético y disminuye el daño hepático asociado al hígado graso de forma específica en las hembras 5xFAD. Estos resultados pueden verse resumidos en un esquema (Figura 12). En este estudio no se incluyó la detección y cuantificación de amiloidosis en el hígado de ratones 5xFAD, así como el efecto del tratamiento del DCI en la patología amiloide en el hígado. Estos resultados no publicados pueden verse resumidos en el siguiente apartado.

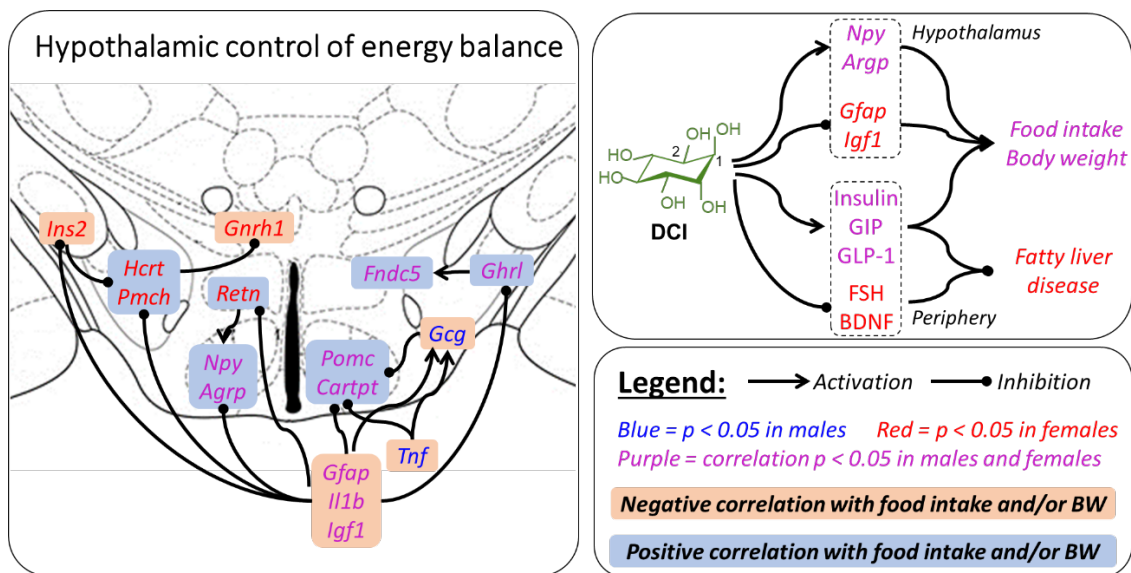


Figura 12. Representación esquemática de la desregulación del control hipotalámico del apetito y la homeostasis energética basada en el análisis de la expresión génica y las asociaciones y el efecto del DCI en la expresión génica. Agrp - proteína relacionada con el agutí; BDNF - factor neurotrófico derivado del cerebro; BW – peso corporal; Cartpt - transcrito regulado por cocaína y anfetamina; Gcg – glucagón; Fndc5 – irisina; Ghrl – grelina; GIP - polipéptido inhibidor gástrico; GLP-1 – péptido similar a glucagón 1; Gnrh1 – hormona liberadora de gonadotropina; Hcrt – orexina; Ins2 – insulina; Igf1 – factor de crecimiento de tipo insulínico 1; Il1b – interleuquina 1 β ; Npy – neuropéptido Y; Pmch – precursor de hormona concentradora de melanina; Pomc – proopiomelanocortina; Retn – resistina; Tnf – factor de necrosis tumoral. Adaptado de López-Gambero et al., 2022 (359).

5.5 Detección de amiloidosis hepática de ratonas hembras 5xFAD y eficacia del DCI en la eliminación de placas amiloides en el hígado (resultados no publicados)

Como se ha descrito previamente, el organismo posee diversos mecanismos para reducir la carga de A β en el cerebro, siendo uno de ellos la eliminación sistémica. Para ello, el péptido A β es trasvasado desde el cerebro hacia el torrente sanguíneo y es internalizado en diversos órganos como el tracto gastrointestinal, riñones y especialmente el hígado a través de su unión al receptor LRP1 y asociado a APOE. El hígado posee la capacidad de eliminar A β a través de actividad de enzimas de degradación o a través de la excreción biliar (316, 317). Se sabe a través de estudios epidemiológicos que los pacientes con NAFLD tienen un riesgo mayor de EA y que, a su vez, los pacientes con EA presentan una menor degradación hepática de A β (75). El péptido A β interfiere en el mecanismo de síntesis y degradación de lípidos, y la acumulación de A β en el hígado promueve un incremento de la neuroinflamación en ratones y acelera el proceso de deterioro cognitivo, evidenciando que la acumulación hepática de A β interfiere negativamente en el desarrollo de la EA (77). La presencia de A β en el hígado interfiere negativamente en la señalización de insulina, la cual participa en la regulación de la síntesis de glucógeno y la lipogénesis, mientras que la enzima degradadora de insulina es esencial para la eliminación hepática de A β (360).

Debido a que en el estudio anterior observamos patología hepática con elevación de enzimas transaminasas y una mayor acumulación de ácidos grasos en el hígado de hembras 5xFAD, decidimos estudiar la presencia y acumulación de A β en el hígado y su posible asociación a la deficiencia en la señalización de insulina en el modelo 5xFAD. Uno de los métodos más establecidos para detectar la presencia de amiloidosis en el hígado es a través de la tinción histológica con rojo Congo. Por ello, realizamos la tinción de rojo Congo en cortes histológicos del hígado de los ratones y encontramos presencia de cúmulos de A β en los animales 5xFAD, la cual no se encontraba en los controles no transgénicos (efecto genotipo: $F_{1, 51} = 102,05$; $p < 0,001$) (**Figura 13A**). Los niveles de A β eran mayores en las hembras 5xFAD (interacción sexo x genotipo: $F_{1, 51} = 9,43$; $p < 0,01$) y se observó que el DCI fue capaz de reducir de forma significativa los niveles de A β hepática en hembras (interacción sexo x genotipo x tratamiento: $F_{1, 51} = 5,12$; $p < 0,05$) (**Figura 13B**). A través de un análisis de regresión múltiple, se encontró una asociación significativa positiva entre los niveles de ácidos grasos en el hígado de hembras con el número de depósitos A β en las hembras 5xFAD ($p < 0,01$) (**Figura 13C**). Este hecho sugiere una relación entre el metabolismo de lípidos en el hígado y un estado patológico asociado a la acumulación intrahepática de A β .

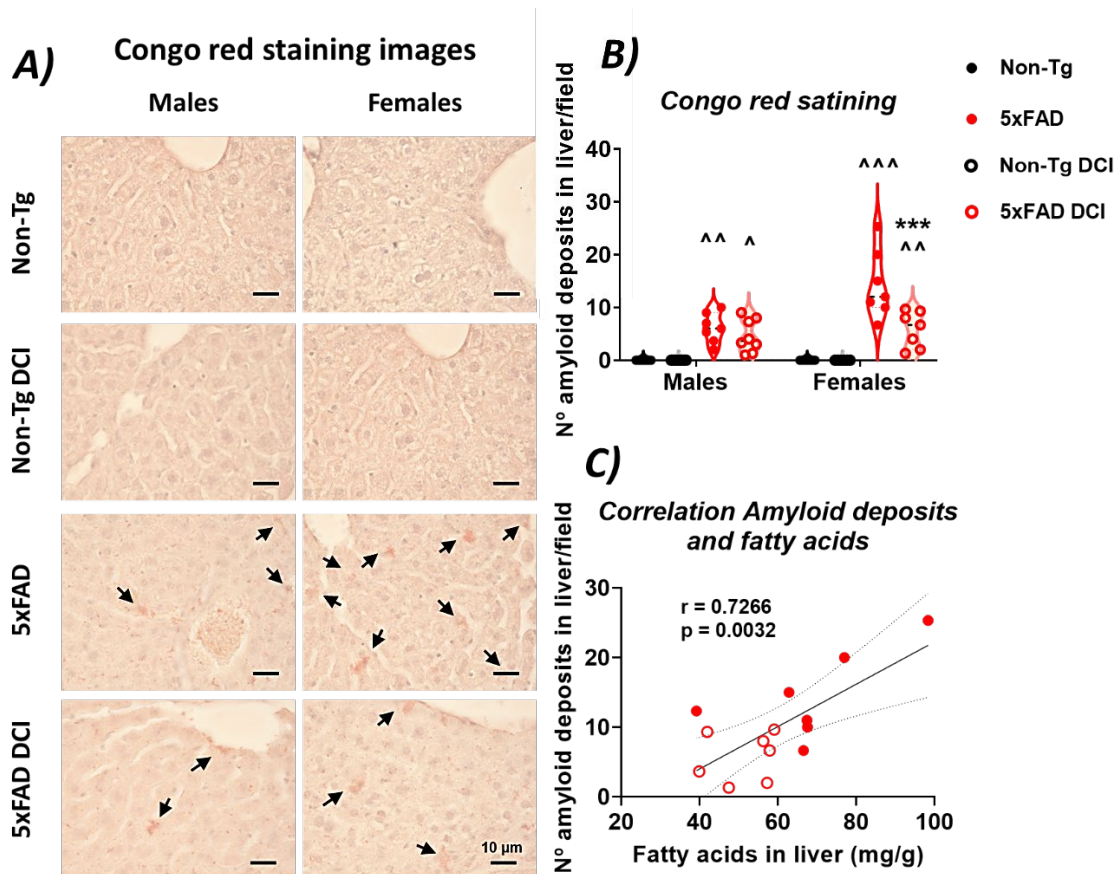


Figura 13. Eficacia del DCI en la acumulación de depósitos amiloides en el hígado de las hembras 5xFAD. A) Tinción de secciones del hígado con Rojo Congo, con deposiciones amiloides señaladas con flechas. B) Conteo total de depósitos de amiloide en secciones del hígado. C) Correlación de Pearson de los niveles de ácidos grasos totales en hígado con el número de depósitos amiloides en el hígado de las hembras 5xFAD. N = 6-9 por grupo. Análisis ANOVA de tres vías (sexo x genotipo x tratamiento) con la prueba post hoc de Tukey; diferencias significativas entre el mismo tratamiento non-Tg (no transgénicos) frente a 5xFAD: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; diferencias significativas entre el mismo genotipo de animales sin tratamiento frente tratados con DCI: ^ = $p < 0,05$, ^^ = $p < 0,01$, ^^^ = $p < 0,001$. DCI – D-Chiro-inositol.

5.6 Alteraciones en la estructura ósea trabecular y cortical en ratones 5xFAD asociadas a un desbalance en los niveles de insulina y eficacia del DCI (resultados no publicados)

Existen diversos estudios epidemiológicos que asocian la enfermedad de Alzheimer con un riesgo elevado de sufrir fracturas óseas y, en el sentido contrario, presentar una BMD en edades avanzadas se encuentra relacionado con un mayor riesgo de EA (136, 137). En general, los pacientes de Alzheimer presentan un mayor índice de fragilidad, el cual depende de diversos factores entre los que se encuentra una salud ósea deteriorada. De hecho, se ha detectado previamente un fenotipo osteoporótico en modelos animales de EA y, aunque existen datos que sugieren que puede estar ligado a una degeneración del hipotálamo y el núcleo del rafe dorsal o incluso a la propia acción del péptido A β en la resorción ósea, los mecanismos aún no están claros (70, 140, 300, 301). La señalización de insulina es esencial para el mantenimiento de la masa ósea a través de la regulación de proteínas implicadas en la formación de hueso como la osteocalcina, de forma que el deterioro óseo se encuentra asociado a la resistencia a la insulina, especialmente en pacientes de edad avanzada (142, 361, 362). Se ha mostrado previamente que el DCI y su análogo DPIN son capaces de inhibir la actividad de los osteoclastos en hueso y reducir la resorción ósea, mostrando resultados prometedores como terapia contra la osteoporosis *in vitro* (102, 103). Por ese motivo, hemos estudiado posibles cambios a nivel morfológico y estructural en el fémur de ratones 5xFAD machos y hembras modelos de EA, tratados con DCI desde los 6 a los 10 meses de edad, para determinar su posible eficacia contra la pérdida ósea. Dada la implicación de la señalización de insulina en el metabolismo óseo, estudiamos la posible asociación entre la pérdida de señalización de insulina en los ratones 5xFAD.

El fémur es un hueso largo que es ampliamente utilizado en modelos animales para determinar cambios en el crecimiento, propiedades biomecánicas, densidad o arquitectura del hueso. Para determinar las posibles alteraciones estructurales de la microarquitectura del hueso, utilizamos un sistema de micro-tomografía computerizada (*Micro-computerized tomography* (micro-CT)) en los fémures de los ratones 5xFAD, el cual fue previamente medido y pesado. La micro-CT permite realizar una reconstrucción tridimensional del hueso y calcular parámetros de la corteza del hueso, así como de sus trabéculas (**Figura 14**).

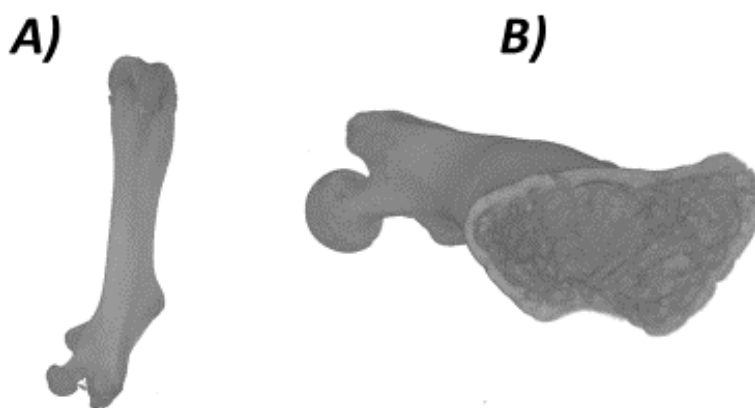


Figura 14. Reconstrucción 3D del fémur por micro-CT. A) Plano externo. B) Corte transversal donde se aprecian la corteza (exterior) y las trabéculas (interior).

En comparación con los animales no transgénicos, los fémures de los animales 5xFAD machos y hembras tenían un menor peso (efecto genotipo: $F_{1,52} = 91,18$; $p < 0,001$), el cual era revertido a un peso normal tras el tratamiento con DCI (interacción genotipo x tratamiento; $F_{1,52} = 12,25$;

$p < 0,001$ (**Figura 15A**). Sorprendentemente, la longitud del fémur en las hembras 5xFAD significativamente menor que el de las hembras no transgénicas (interacción genotipo x sexo: $F_{1,52} = 16,78$; $p < 0,001$), lo cual indica que la patología amiloide afecta al crecimiento longitudinal del hueso desde el nacimiento en las hembras 5xFAD (**Figura 15B**). A pesar de esta menor longitud del fémur, no la relación peso/longitud seguía evidenciando un menor peso óseo tanto en machos como en hembras (efecto genotipo: $F_{1,52} = 100,01$; $p < 0,001$), con un efecto significativo del DCI revirtiendo este efecto (interacción genotipo x tratamiento: $F_{1,52} = 13,62$; $p < 0,001$) (**Figura 15C**).

En el análisis del hueso trabecular por micro-CT, se observó que los ratones 5xFAD presentaban una menor fracción del volumen óseo (*bone volumen fraction*), (efecto genotipo: $F_{1,52} = 4,01$; $p < 0,05$) el cual está asociado a la competencia mecánica, fuerza y rigidez del hueso trabecular, y a su vez está relacionado con el número de trabéculas, el cual se encontraba igualmente disminuido en los ratones 5xFAD (efecto genotipo: $F_{1,52} = 4,04$; $p < 0,05$). El hecho de mostrar un número de trabéculas menor se tradujo en un mayor espacio o separación entre trabéculas (efecto genotipo: $F_{1,52} = 3,79$; $p < 0,05$). Además, mientras que los machos 5xFAD presentaban un mayor grosor de trabéculas, éste era menor en las hembras (interacción sexo x genotipo: $F_{1,52} = 7,50$; $p < 0,01$). El tratamiento con DCI normalizó en los animales 5xFAD la fracción de volumen óseo (interacción genotipo x tratamiento: $F_{1,52} = 5,44$; $p < 0,05$), número de trabéculas (interacción genotipo x tratamiento: $F_{1,52} = 4,96$; $p < 0,001$), separación de trabéculas (interacción sexo x genotipo x tratamiento: $F_{1,52} = 4,07$; $p < 0,05$), pero no el grosor trabecular. (**Figura 15D-F**). Puesto que la señalización de la insulina puede influir en la remodelación ósea, realizamos un análisis de regresión múltiple y encontramos una asociación positiva significativa entre los niveles de insulina plasmática en hembras con el número de trabéculas ($p < 0,05$) así como una asociación negativa con la separación trabecular ($p < 0,05$), sugiriendo que la capacidad del DCI de normalizar los cambios en la composición ósea en hembras 5xFAD puede surgir, en parte, por un aumento de la señalización de insulina (**Figura 15H, I**).

Además de las trabéculas, analizamos también la microarquitectura de la corteza del fémur y encontramos una disminución del grosor cortical medio en los animales 5xFAD (efecto genotipo: $F_{1,52} = 20,92$; $p < 0,001$) y más específicamente en hembras (interacción sexo x genotipo: $F_{1,52} = 4,08$; $p < 0,05$), el cual se encuentra asociado a la densidad ósea, al área cross-seccional total, también disminuido en 5xFAD (efecto genotipo: $F_{1,52} = 24,20$; $p < 0,001$) y mayormente en hembras (interacción sexo x genotipo: $F_{1,52} = 4,02$; $p < 0,05$) y al área cortical en 5xFAD (efecto genotipo: $F_{1,52} = 25,34$; $p < 0,001$) y, de nuevo, especialmente en hembras (interacción sexo x genotipo: $F_{1,52} = 4,21$; $p < 0,05$). El tratamiento con el DCI, de nuevo, aumento significativamente en hembras 5xFAD los niveles de grosor cortical medio (interacción sexo x genotipo x tratamiento: $F_{1,52} = 5,34$; $p < 0,05$), área cross-seccional total (interacción sexo x genotipo x tratamiento: $F_{1,52} = 6,58$; $p < 0,05$) y área cortical (interacción sexo x genotipo x tratamiento: $F_{1,52} = 6,81$; $p < 0,05$) (**Figura 15J-M**). Al igual que en la estructura trabecular, se encontró una asociación significativa entre los niveles plasmáticos de insulina en hembras 5xFAD con el grosor cortical medio ($p < 0,001$) y el área cortical ($p < 0,001$) (**Figura 15N, O**), evidenciando el papel de la señalización de insulina en la alteración estructural del hueso en las hembras 5xFAD.

En conjunto, estos resultados muestran que el modelo 5xFAD reproduce un fenotipo de pérdida de masa ósea y una alteración estructural que es una de las posibles causas de la mayor incidencia de osteoporosis y riesgo de fracturas en pacientes con EA. Nuestros hallazgos sugieren que el DCI puede ser un tratamiento efectivo para evitar la pérdida ósea en pacientes con EA, a través de una mejora de la señalización de la insulina.

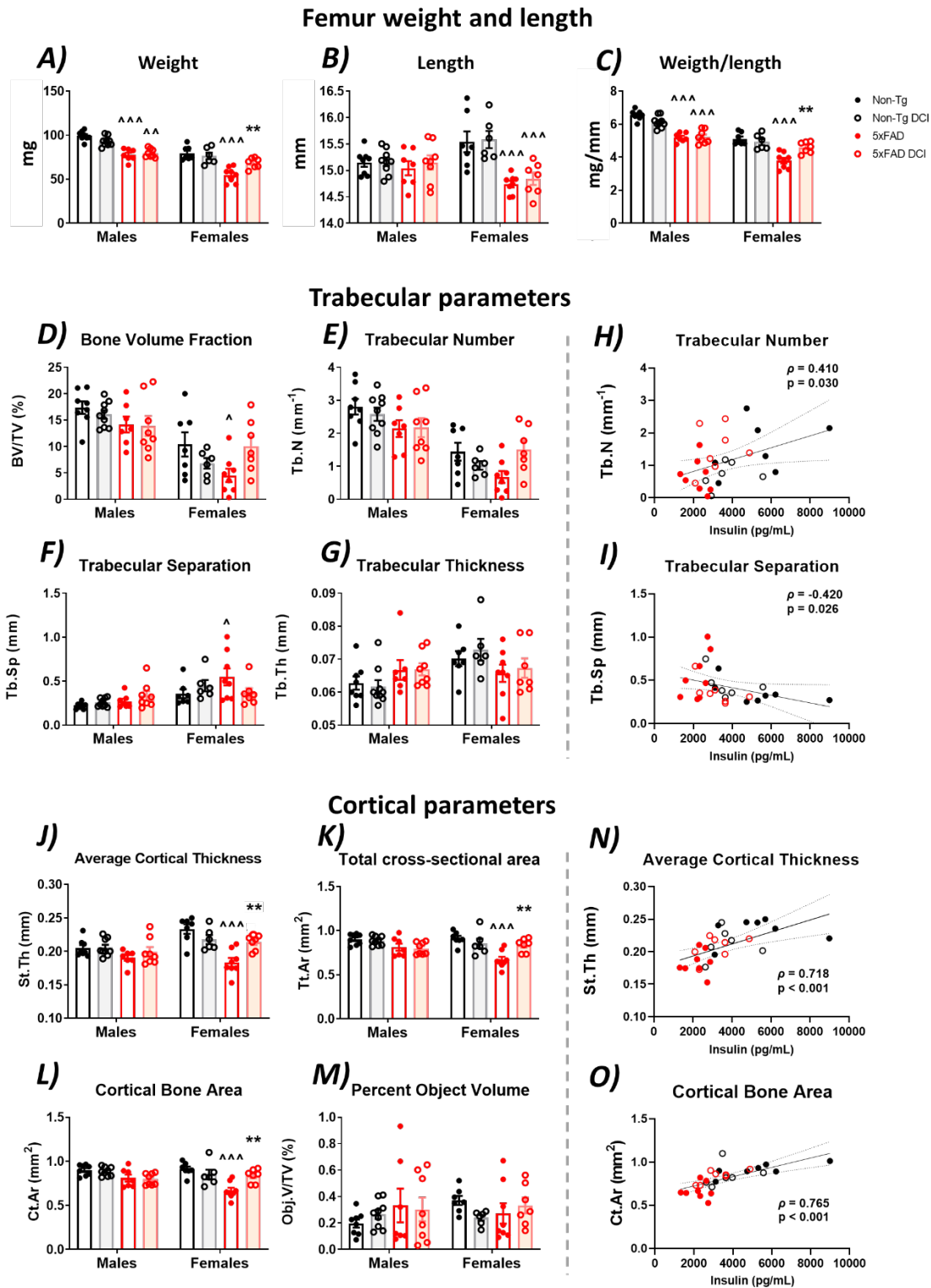
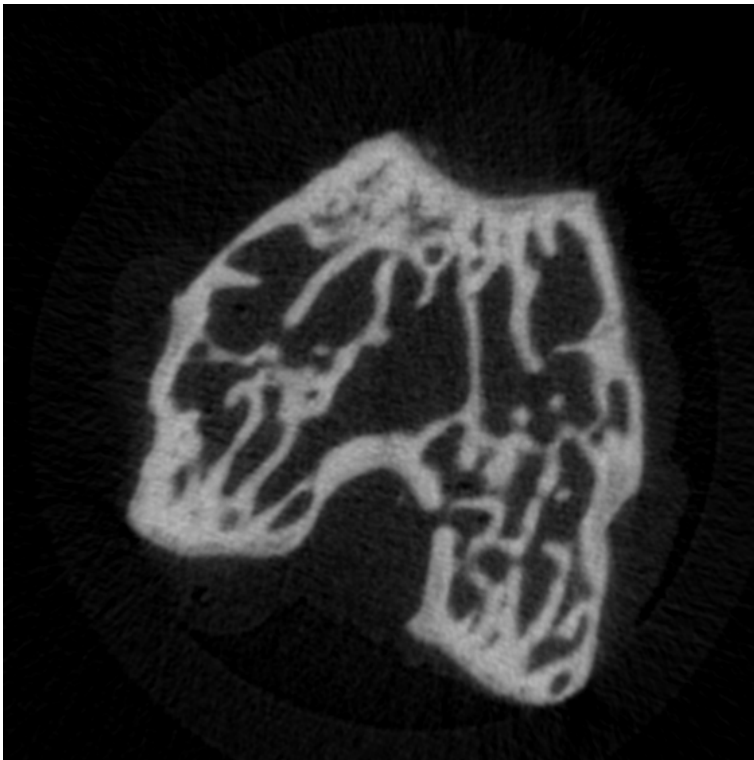


Figura 15. Parámetros auxológicos y alteración de la microestructura trabecular y cortical del fémur de los ratones 5xFAD a los 10 meses de edad y efecto del tratamiento con DCI. A-C) Peso y longitud del fémur. D-F) Parámetros de la microarquitectura trabecular del fémur de los ratones 5xFAD. H-I) Correlación de Pearson de del número y separación de las trabéculas del fémur con los niveles de insulina en plasma de las hembras 5xFAD. J-M) Parámetros de la microarquitectura cortical del fémur de los ratones 5xFAD. N-O) Correlación de Pearson del grosor medio y el área cortical del fémur con los niveles de insulina en plasma de las hembras 5xFAD. Análisis ANOVA de tres vías (sexo x genotipo x tratamiento) con la prueba post hoc de Tukey; diferencias significativas entre el mismo tratamiento non-Tg (no transgénicos) frente a 5xFAD: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; diferencias significativas entre el mismo genotipo de animales sin tratamiento frente tratados con DCI: \wedge = $p < 0,05$, $\wedge\wedge$ = $p < 0,01$, $\wedge\wedge\wedge$ = $p < 0,001$. DCI – D-Chiro-inositol; Non-Tg – no transgénicos.

6. DISCUSIÓN



En este trabajo de tesis doctoral se ha tratado de estudiar la eficacia del tratamiento con DCI, un compuesto natural que interviene y activa la señalización de insulina, posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, como potencial tratamiento para la EA en estadios tempranos. La caracterización de los mecanismos fisiopatológicos de la EA en estadios tempranos es esencial para evaluar las dianas de tratamiento susceptibles de ser tratadas con el DCI. Esencialmente, en estados prodrómicos de la EA se observan cambios a nivel metabólico y hormonal que incrementan el riesgo de padecer EA, entre los que se incluyen un menor peso corporal acompañado de pérdida de peso progresiva, niveles bajos de insulina y resistencia a insulina cerebral, disfunción hepática u osteoporosis. Se han descrito estos procesos en un modelo transgénico de EA como el ratón 5xFAD, permitiendo analizar la eficacia de la administración de DCI aminorando y frenando el deterioro metabólico y cognitivo progresivo en estos animales.

Las aportaciones más relevantes de este trabajo que se discutirán en esta sección se detallan a continuación:

- Primero se realizó un estudio descriptivo de la actividad fisiológica de los inositoles, proponiendo un modelo de ruta de señalización de la insulina donde participa el DCI, y describiendo su capacidad antioxidante según los resultados vistos hasta el momento. Posteriormente, se ha profundizado en la capacidad del DCI como posible tratamiento para la EA, interviniendo en la formación y toxicidad del péptido A β además de otras posibles dianas de tratamiento relacionadas con la disfunción metabólica en la periferia y poniendo de manifiesto aquellos ensayos clínicos en marcha que involucran inositoles y derivados del DCI.
- Posteriormente, se trató de caracterizar aquellos mecanismos que conllevan alteraciones fisiológicas y metabólicas que se observan en la EA en estados prodrómicos, tanto a nivel central como en la periferia. En este estudio, se emplearon ratones modelos de la EA, el ratón 5xFAD, en los cuales se definieron cuáles eran las alteraciones estructurales y de señalización endocrina en el hipotálamo, así como en la periferia, que podrían influir en un balance energético negativo y una pérdida de peso en los ratones 5xFAD de forma similar a como se ha observado en pacientes EA. Se emplearon ratones tanto machos como hembras homocigotas para las mutaciones (Tg^{5xFAD/5xFAD}) como heterocigotos (Tg^{5xFAD/-}) para observar los efectos de penetrancia de las mutaciones y posibles diferencias entre sexos, dada la mayor incidencia de la EA en mujeres. Los principales hallazgos de este estudio fueron que, a pesar de no hallarse rastros de placas difusas o neuríticas en el hipotálamo en una edad donde empiezan a manifestarse los primeros síntomas cognitivos, existe una disfunción hipotalámica asociada a un proceso inflamatorio de activación glial y una disminución de la respuesta a señales hormonales como la insulina y GLP-1, las cuales se encontraban en niveles disminuidos en plasma, además de la señalización de leptina o grelina. Se determinó que el proceso inflamatorio en el hipotálamo y la pérdida de señalización hormonal estaban relacionados con la pérdida de peso en los animales 5xFAD, la cual resultaba más pronunciada en hembras y a su vez era debida a una menor ingesta de los animales, compensada con una disminución del gasto energético, patrón observado durante el envejecimiento. En un análisis bioquímico, se encontraron indicios de daño hepático y una desregulación de los niveles de colesterol en plasma específicamente en hembras 5xFAD, los cuales podrían estar asociados a una desregulación del metabolismo lipídico. La definición de los mecanismos de pérdida de señalización de insulina, inflamación hipotalámica y daño hepático sirvieron para establecer aquellas dianas susceptibles de un tratamiento con

DCI, el cual posee propiedades sensibilizantes de insulina, antiinflamatorias y hepatoprotectoras.

- El último estudio publicado trató de evaluar la capacidad del DCI de revertir el balance energético negativo en los ratones 5xFAD, centrandose los efectos del DCI en los parámetros de ingesta, gasto energético, inflamación hipotalámica, niveles hormonales en plasma y patología hepática. En este estudio, se emplearon homocigotos 5xFAD machos y hembras y se observó que un tratamiento con DCI desde los 6 meses de edad, donde por primera vez se describieron los mecanismos fisiopatológicos del metabolismo en este modelo, hasta los 10 meses de edad, fue capaz de revertir la pérdida de peso progresiva, en parte al regular la ingesta de los animales 5xFAD, además de frenar el deterioro de la memoria a corto plazo y la flexibilidad cognitiva. Esta regulación de la ingesta fue asociada a una disminución en los parámetros de inflamación en el cerebro, especialmente en la activación astrocitaria (determinada por la expresión e inmunorreactividad de GFAP), y la normalización de los niveles de expresión de los neuropéptidos hipotalámicos encargados de controlar la ingesta y el gasto energético, como *Npy*, *Agrp* o *Pomc*, entre otros. Además, el tratamiento con DCI normalizó los niveles anormalmente bajos de insulina, GIP y GLP-1 en los animales 5xFAD, lo cual a su vez estaba asociado al proceso inflamatorio hipotalámico y la pérdida de peso. Las hembras 5xFAD mostraron un fenotipo de hígado graso, asociado a niveles bajos de insulina y a niveles elevados de FSH, indicativos de menopausia, y BDNF, asociado a procesos inflamatorios. El tratamiento con DCI logró revertir la acumulación de ácidos grasos hepática en el hígado de las hembras 5xFAD. En un estudio posterior, se observó que el hígado de los animales 5xFAD presentaba depósitos de amiloide, siendo estos mayores en las hembras 5xFAD y estando relacionados con los niveles de ácidos grasos. El tratamiento con DCI disminuyó el número de placas amiloides hepáticas en hembras, evidenciando un mecanismo de hepatoprotección. Además, los animales 5xFAD mostraron una pérdida de masa ósea, especialmente las hembras 5xFAD, ligada a la señalización de insulina y normalizada por el tratamiento con DCI.

En los siguientes apartados, se discuten los principales resultados obtenidos en durante esta Tesis Doctoral.

6.1 El DCI como tratamiento de la EA

Existe una enorme demanda insatisfecha de terapias dirigidas a la EA en sus fases iniciales e intermedias. La mayoría de las terapias farmacológicas destinadas a reducir o promover la eliminación de A β han resultado infructuosas. De hecho, aquellas terapias que reducen significativamente los niveles de A β en el cerebro, son incapaces de frenar de forma significativa el avance del deterioro cognitivo en los pacientes de EA, lo cual sugiere que no sólo A β , sino otros factores no tan bien definidos, son los que en conjunto determinan el avance de la patología de Alzheimer. Uno de los elementos clave para abordar el tratamiento y la prevención de la EA es la falta de herramientas objetivas de diagnóstico y seguimiento. Los estudios epidemiológicos revelan que tanto la pérdida de peso y la obesidad en la mediana edad, la alteración de parámetros metabólicos como la hiperglucemia, la hipo e hiperinsulinemia, la hipoleptinemia, el daño hepático, la osteoporosis y los cambios en el microbiota están positivamente correlacionados con el desarrollo de la EA en humanos (11, 363, 364). Actualmente, existen enfoques farmacológicos preclínicos y ensayos clínicos recientes basados en el uso de fármacos normalmente estudiados en la diabetes, como la metformina o la propia insulina intranasal, en la EA (365-367). Otro enfoque propuesto es el uso de nutracéuticos, sustancias naturales incluidas en la dieta como el DCI, que es un agente conocido por actuar como mensajero no canónico y sensibilizar los tejidos a las acciones de la insulina. El DCI y su derivado 3-O-metilado, DPIN (el cual sufre desmetilación ácida y conversión a DCI en el estómago) han demostrado ser eficaces para el tratamiento de la diabetes, y el hígado graso, además de mostrar resultados prometedores *in vitro* contra el depósito de A β , la actividad inhibidora de la γ -secretasa, y la disminución de la hiperfosforilación de Tau en roedores (87).

6.1.1 El DCI promueve la señalización de insulina y ejerce un efecto antioxidante y antiinflamatorio

En el primer estudio, hemos evaluado el uso de nutracéuticos como los inositoles, que son en su mayoría componentes del organismo humano y se adquieren generalmente a través de la dieta. El uso de nutracéuticos se muestra en auge debido al cambio de tendencia de los medicamentos farmacológicos y la búsqueda de alternativas basadas en compuestos naturales. Estas moléculas pueden derivarse de procesos biotecnológicos de extracción en plantas o de fermentación, como remanentes de la producción alimentaria, suponiendo una alternativa a los procesos de síntesis química. En este sentido, realicé una estancia de investigación de un año en la empresa biotecnológica EURONUTRA S.L., donde participé en ensayos de farmacocinética del DCI y DPIN en humanos y en el proceso de obtención del DCI a partir de vainas de algarroba en un proceso industrial encadenado sin el uso de solventes orgánicos contaminantes.

Los inositoles, esencialmente el myo-inositol y el DCI, suelen estar presentes tanto en el citoplasma como en los fosfolípidos y glucanos de las membranas plasmáticas y tienen una gran relevancia como segundos mensajeros en la señalización de insulina. Desde el descubrimiento de un pseudodisacárido formado por DCI y galactosamina con propiedad insulin-mimética aislado del hígado de terneros, se ha tratado de elucidar el mecanismo a través del cual el DCI actúa en la ruta de señalización de insulina (368). En nuestro estudio, hemos definido que el DCI es capaz de actuar en la señalización de insulina de tres formas: 1) actuando en forma de inositol-glucano, un pseudodisacárido formado por galactosamina y DCI 3-O-metilado (DPIN) en un enlace β -1,4; el cual es un modulador alostérico de PP2C y PDHP; 2) estimulando la señalización de insulina por la vía no canónica, en forma de IPGs anclados a la membrana cuya liberación

estimulada por una PLD activada por la insulina promueve la señalización de proteínas como pp59^{Lyn} sobre IRS1, segundos mensajeros del receptor de insulina; y 3) modulando la secreción directa de insulina. En casos de resistencia a insulina y diabetes se observa una disminución de los niveles de DCI en los tejidos, el cual es debido a una menor actividad de la enzima epimerasa activada por insulina, que cataliza la conversión de myo-inositol en DCI. Por tanto, los niveles de DCI en plasma son un biomarcador de resistencia a insulina. De este estudio, podemos destacar que, a pesar de que el mecanismo más aceptado por el cual el inositol promueve la señalización de insulina es a través de su incorporación a IPGs en la membrana, éste es un proceso que se produce en el retículo endoplasmático y que deriva en una respuesta a la insulina a medio-largo plazo. Sin embargo, la rápida capacidad del DCI de promover la señalización de insulina cuando es administrada de forma aguda sugiere que el DCI participa directamente estimulando la señalización de insulina y actúa sinérgicamente proveyendo de sustrato como segundos mensajeros en su ruta de señalización. El DCI ha mostrado la capacidad de reducir la demanda de insulina en tejidos periféricos en casos de hiperinsulinemia, promoviendo directamente la señalización de insulina y disminuyendo la secreción pancreática de insulina. No obstante, en aquellos casos en los que se desarrolla una insuficiencia de células β -pancreáticas e hipoinsulinemia, como en estadios avanzados de resistencia a insulina o en daño pancreático, el DCI es capaz de estimular y prolongar la secreción de insulina como se observa en pacientes diabéticos dependientes de sulfonilureas (las cuales estimulan la liberación de insulina, insulina al cerrar los canales de K⁺ en las células β -pancreáticas, de forma similar al mecanismo descrito por el DCI (81, 125). Esto sugiere que el DCI es capaz de preservar la funcionalidad de las células β -pancreáticas en diferentes situaciones patológicas.

El DCI, además, ha mostrado capacidad antiinflamatoria, disminuyendo la expresión y los niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF- α o IL-6, además de estimular la actividad de enzimas antioxidantes como la CAT, SOD, GSH o GPx (93-98). Dado que la deficiencia de insulina en modelos de T1DM provoca una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes y un aumento de la producción de especies reactivas, es posible que el DCI promueva la expresión de enzimas antioxidantes a través de la estimulación de intermediarios de la ruta de insulina (369). Varios intermediarios de la ruta de la insulina se encuentran involucrados, en la respuesta contra el estrés oxidativo celular, como Akt o ERK, o mTOR, las cuales son activadas directamente por el DCI, lo cual podría contribuir a la respuesta a estrés oxidativo mostrada *in vitro* en ausencia de insulina (355). Hasta ahora, la mayoría de los estudios sobre la acción antioxidante del DCI se centran en modelos animales. Los estudios realizados en tejido humano son escasos, si bien el DCI ha mostrado *in vitro* una inducción de la actividad de enzimas antioxidantes mediante el estímulo de la señalización de insulina en células humanas. El consumo de DPIN en pacientes con NAFLD reduce el estrés oxidativo y la acumulación de ácidos grasos en el hígado, mientras que otro estudio prospectivo con mujeres con síndrome de ovario poliquístico (*polycystic ovary syndrome* (PCOS)) ha mostrado que la suplementación con DCI durante dos meses reduce la formación de grupos tiol, marcadores de estrés oxidativo, mejorando la disfunción del endotelio vascular (370, 371). Además, el DCI es capaz de disminuir la acumulación de ácidos grasos en el hígado, así como promover la lipogénesis en el tejido adiposo visceral, que junto a la capacidad del DCI de regular los procesos inflamatorios asociados al estrés oxidativo y promover la señalización de insulina lo convierten en un candidato ideal para el tratamiento de trastornos metabólicos (86).

6.1.2 El DCI evita el daño neuronal causado por A β y reduce la hiperfosforilación de tau

Los inositoles son candidatos sólidos para el desarrollo de nuevos enfoques para el tratamiento o la mejora de las enfermedades crónicas asociadas al envejecimiento, especialmente las vinculadas a la resistencia a la insulina y al estrés oxidativo como la EA. Por ello, durante los últimos años se ha estudiado el efecto del tratamiento con DCI y sus análogos sobre las características moleculares de la EA (formación y acumulación de A β , hiperfosforilación de tau o muerte neuronal), dado que se sabe que el DCI atraviesa la barrera hematoencefálica y se ha descrito su presencia en el cerebro. A nivel central, el isómero del DCI, el myo-inositol, cumple un papel de la ósmosis intracelular y controla las respuestas de las neuronas y la glía a los entornos externos. En este sentido, los trastornos psiquiátricos como la depresión y la ansiedad se asociaron a desequilibrios en el contenido de myo-inositol en el cerebro, mientras que el DCI, sin embargo, se encuentra en menor cantidad en tejido cerebral y no cumple la función de osmolito. No obstante, se ha descrito que el DCI evita el daño neuronal y la degeneración de los axones a través de un mecanismo asociado a la disminución del estrés oxidativo en ratones con deficiencia de insulina (107), además de además mostrar un efecto antienvjecimiento en *Drosophila melanogaster*, a través de un aumento de la señalización de insulina y la regulación de los mecanismos de autofagia, cuya disrupción es una característica de envejecimiento y muerte celular (105, 106). Por otra parte, se ha demostrado en cultivos de células microgliales que el DPIN inhibe la respuesta inflamatoria reduciendo la producción de ROS, NOS, prostaglandinas y la expresión de la expresión de citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 en un mecanismo asociado a la activación de TREM2 y la inhibición de NF- κ B (108).

Se ha descrito que otros isómeros naturales del DCI como el scyllo-inositol o el epi-inositol son capaces de unirse por polaridad a los péptidos A β , impidiendo su oligomerización (372-375). No obstante, el DCI no posee esta capacidad por la disposición espacial diferente de sus grupos alcohólicos. Si bien el DCI no evita la agregación de A β , es capaz de reducir la capacidad citotóxica de los oligómeros de A β . El DCI y sus análogos DPIN y el pseudodisacárido INS-2 promueven la señalización de insulina en neuronas hipocampales *in vitro* y, de esta forma impiden la unión de los oligómeros de A β a receptores de la membrana celular, impidiendo su efecto neurotóxico sobre éstas. (1, 376). También se ha descrito previamente que el DCI y el DPIN disminuyen la producción de A β , inhibiendo la ruta de procesamiento amiloidogénica de APP mediada por la γ -secretasa, sin alterar el procesamiento de notch (87). El DPIN ha formado hasta el momento en parte de dos ensayos clínicos en fase 2, en los cuales se les administraba a pacientes con EA moderada, reclamando una actividad inhibitoria de la γ -secretasa y sensibilizante de insulina, mostrando una estabilización de la cognición determinada por la prueba ADAS-Cog (104). No obstante, hasta hoy no se ha reportado ningún estudio en fase 3 del uso del DPIN como tratamiento de la EA.

En este trabajo de Tesis Doctoral, he colaborado en un estudio de la acción del DPIN sobre tau, dada la capacidad de la insulina de inhibir proteínas quinasas como GSK-3 β o CDK5 (51, 109). En este mecanismo, generalmente GSK-3 β dispara la actividad de CDK5 a través del incremento de niveles intracelulares de calcio en neuronas, resultando en la activación de calpaína y por consiguiente la escisión de p35 en p25 y p10, activando a CDK5. En este estudio, que no está incluido este trabajo de Tesis Doctoral, hemos descrito que el DCI y el DPIN es capaz de regular y disminuir la fosforilación de tau en el hipocampo de ratas y el modelo ratón 3xTg a través de un mecanismo asociado a la inhibición de CDK5 de forma independiente a GSK-3 β u otras proteínas quinasas reguladoras de tau. Este trabajo fue publicado recientemente (88) y nos

permitió registrar la patente “*Composition for preventing and treating tauopathies*” WO2021048195A9, registrada en China, Japón, Canadá, Estados Unidos y Europa (110). Este trabajo implica que el DCI posee múltiples dianas en la EA asociadas a su mecanismo de acción.

Nosotros hemos abordado la EA desde el punto de vista de las etapas iniciales de la enfermedad, ya que el proceso de envejecimiento está estrechamente relacionado con el desarrollo de disregulaciones metabólicas que conducen a la resistencia a la insulina, donde los inositoles podrían tener un potencial uso beneficioso. Esta revisión exhaustiva del papel fisiológico de los inositoles nos ayuda a comprender qué beneficios puede aportar su administración externa. El hecho de que en la última década se haya aumentado el número de patentes y hayan comenzado a realizarse ensayos clínicos sobre el uso de inositoles como el DCI o sus análogos en la EA responde a una necesidad y abre una vía a la expansión en el uso de los inositoles como posible tratamiento. La descripción de los mecanismos de disregulación metabólica que ocurren en los pacientes de EA asociados a un desbalance de la señalización de insulina y procesos inflamatorios asociados son vitales para evaluar la eficacia del DCI.

6.2 La patología amiloide en la pérdida de peso en la EA

La evidencia de estudios epidemiológicos ha puesto de manifiesto que la pérdida de peso es uno de los eventos que preceden a la aparición de síntomas de deterioro cognitivo en pacientes de EA, y que, además, poseer un IMC anormalmente bajo en la mediana edad es un factor de riesgo para el desarrollo de la EA (377). Este hecho no sólo se observa en pacientes con EA esporádica, dado que un estudio que comparaba el IMC de 230 pacientes con mutaciones de EA familiar (*APP*, *PS1* y *PS2*) presentaban un IMC significativamente más bajo que la media más de 10 años antes de la edad esperada para aparición de los síntomas cognitivos en la EA familiar (50-65 años) (59). En otro estudio longitudinal se encontró que la pérdida de peso a lo largo del tiempo es un marcador de deterioro cognitivo en aquellos pacientes que mostraban una patología amiloide determinada por los niveles de $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ en el líquido cefalorraquídeo, lo cual sugiere que la pérdida de peso ocurre de forma coetánea a la acumulación de $A\beta$ (124). Esta idea refuerza el uso del ratón 5xFAD como modelo de estudio en nuestro trabajo, dado que es el modelo de EA que más fielmente reproduce los eventos de la patología amiloide en el cerebro.

En general, a medida que la edad avanza, a partir de los 65-70 años se produce una pérdida de peso gradual tanto de tejido adiposo blanco como de masa magra, asociados a cambios en el patrón de ingesta y el gasto energético, el cual disminuye para adaptarse a la disponibilidad de nutrientes en el cuerpo (378). La pérdida de apetito con la edad está relacionada con muchos factores, entre los cuales se encuentran la pérdida de la motivación para alimentarse de forma adecuada por el aislamiento social o la institucionalización (existiendo una estrecha relación entre la anorexia y la depresión), un deterioro progresivo de la habilidad de masticar y deglutir, una pérdida de la capacidad olfatoria y del sentido del gusto que derivan en una menor motivación para la ingesta, la presencia de neuroinflamación y alteraciones en el mecanismo regulador de la ingesta en el hipotálamo y la sensibilidad a señales hormonales y metabólicas indicativas del estado metabólico del organismo (378). Si bien todos estos factores pueden contribuir al deterioro cognitivo en pacientes de EA, aún no se han descrito los mecanismos asociados a la pérdida de peso en pacientes con patología amiloide más de 10 años antes de la aparición de deterioro cognitivo. En nuestro trabajo de caracterización metabólica del ratón 5xFAD, quisimos determinar cuáles eran los cambios fisiológicos asociados a la pérdida de peso en un modelo animal que genera acumulación de $A\beta$ de forma similar a los humanos.

6.2.1 Pérdida de peso y alteraciones en la ingesta y gasto energético en el modelo 5xFAD

En nuestro estudio número 2, encontramos que los ratones macho y hembra 5xFAD ya presentaban menor peso corporal que los animales no transgénicos y decidimos determinar si la pérdida de peso de los animales 5xFAD se encontraba asociada efectivamente a una disminución de la ingesta y, explorando posibles diferencias ligadas al sexo. Encontramos que la disminución del peso corporal se encontraba principalmente a una disminución de la ingesta de alimentos, de forma más destacada durante la fase activa (noche), coincidiendo con el menor peso corporal y la pérdida de apetito mostrada por hembras 5xFAD a la misma edad de acuerdo con otro estudio (350). En el estudio número 3 de esta tesis doctoral, profundizamos en estos hallazgos y observamos que, a pesar de que la ingesta en los 5xFAD a los 10 meses de edad se disminuía de forma significativa durante la noche, la distribución de la ingesta durante el día y la noche no se encontraba alterada significativamente, descartando que la pérdida de apetito fuese específica de un período del día, sino como consecuencia de la ingesta acumulada durante las 24 horas. Este hallazgo es importante, dado que se han descrito alteraciones del ritmo circadiano en pacientes de EA y hemos encontrado alteraciones en niveles de neuropéptidos hipotalámicos asociados a la ingesta regulada por el ritmo circadiano, por lo que otros factores contribuyen en conjunto a la pérdida de apetito del animal 5xFAD. El hecho de que la pérdida de peso y la menor ingesta registrada se diera en los ratones 5xFAD homocigotos de forma más pronunciada que en los animales heterocigotos para las mutaciones, sugiere que la penetrancia de la patología amiloide está directamente relacionada con la aparición de alteraciones en el metabolismo.

Como se ha descrito previamente, el sentido del olfato y del gusto juegan un papel importante en la motivación para el consumo de alimentos (379, 380). La hiposmia es una característica clínica que se manifiesta temprano en la EA (381, 382). Previamente se ha observado que los ratones 5xFAD presentan acumulación de A β en neuronas sensoriales olfativas y el epitelio olfatorio, mostrando respuestas alteradas a ciertos olores a los 3 meses de edad. El cambio de patrón de la preferencia por olores es más acusado en las hembras a los 6 meses de edad, mientras que los machos 5xFAD tienen una menor habilidad para distinguir olores a esa edad, aunque ambos ratones 5xFAD son capaces de recordar olores previos en edades avanzadas (380, 383-385). En un estudio previo, se ha mostrado que los ratones 5xFAD tienen dificultades para encontrar la comida cuando ésta se encuentra oculta (386). Sin embargo, esta prueba se basa en la capacidad de coordinación de los animales y no muestra la motivación para la ingesta cuando ésta se encuentra disponible *ad libitum*, por lo que, aunque es plausible pensar que la pérdida del sentido olfatorio podría influir en la motivación para la ingesta de los animales 5xFAD, aún son necesarios estudios que correlacionen la patología amiloide en las neuronas sensoriales del bulbo olfatorio la ingesta en este modelo de EA.

Aunque estudios previos sugieren que la pérdida de peso en los ratones 5xFAD podría ser a causa de la hiperactividad (349), como ocurre en otros modelos transgénicos de EA como los ratones Tg4510 y 3xTg (119, 387, 388), nosotros hallamos que los animales 5xFAD mostraban una tasa metabólica más baja. En principio, planteamos la hipótesis de que esta disminución del gasto energético podría estar asociada con una adaptación a la menor disponibilidad de energía y a la pérdida de movilidad relacionada con la neurodegeneración, como se observó previamente en las hembras 5xFAD a una edad más temprana que en este estudio (348, 350). Si bien encontramos una pérdida de movilidad a 6 meses de edad en los ratones 5xFAD, a los 10 meses de edad, la actividad locomotora se había normalizado con la de los ratones no

transgénicos, lo que sugiere que los ratones 5xFAD sufren una pérdida de movilidad prematura y cambios adaptativos en el gasto energético frente a una ingesta disminuida y una a la menor actividad locomotora. Otros modelos de EA sí han mostrado una hiperactividad temprana, la cual eleva el gasto energético. La particularidad de estos modelos es que portan mutaciones en *MAPT*, promoviendo la hiperfosforilación de tau, la cual puede ser la causa del hipermetabolismo observado (388, 389). De hecho, cuando se suprime la sobreexpresión del transgén de tau en el modelo Tg4510 de EA, se atenúa la hiperactividad, confirmando la relación causal entre tau y cambios en la actividad locomotora, la cual parece asociada a la hiperexcitabilidad de neuronas hipocampales en presencia de tau hiperfosforilada (389, 390).

En nuestro trabajo, también descubrimos que los ratones 5xFAD tenían un cociente respiratorio (RQ) más bajo a los 10 meses de edad, aunque solo las hembras 5xFAD lo presentaban ya a los 6 meses. Dado que la disminución del RQ se correlaciona con un mayor consumo de O₂ en la β-oxidación de los lípidos, estos datos sugieren un descenso en la ratio de uso de carbohidratos y un aumento de la utilización de ácidos grasos como fuente de energía. Este aumento en del uso de los ácidos grasos como combustible puede ser un factor de riesgo para la aparición de la EA. La presencia del alelo APOE4, que tiene una mayor incidencia en las mujeres portadoras, es uno de los factores de riesgo más reveladores de la aparición tardía de la EA. Estudios anteriores han demostrado que ratones que portan el alelo de APOE-ε4 tienen menor peso corporal y masa grasa y utilizan más ácidos grasos como combustible (391). Un estudio en mujeres jóvenes portadoras de APOE-ε4 mostró una disminución del gasto energético en reposo y un cambio metabólico favoreciendo la glucólisis aeróbica en lugar de la fosforilación oxidativa de la glucosa (392). En general, los fenómenos observados en los ratones 5xFAD aportaron pruebas de que el balance energético negativo que experimentan los pacientes con EA está, al menos en parte, relacionado con cambios en el apetito y el gasto energético, y que estas alteraciones parecen ser más susceptibles de ocurrir en las mujeres. Si bien el cambio de tendencia del apetito puede deberse a diversos factores sociales y fisiológicos como los describimos antes, nos centramos en el estudio del hipotálamo, dado que es la principal región cerebral encargada de integrar las señales periféricas relativas a la disponibilidad de nutrientes y estado metabólico y se ha observado que los pacientes de EA presentan atrofia hipotalámica en estados tempranos de la EA (70).

6.2.2 La disfunción hipotalámica y la inflamación en el modelo 5xFAD

El hipotálamo, como se ha descrito antes, es uno de los principales actores que regulan el balance energético en el organismo. La atrofia hipotalámica y la disfunción neuronal en el hipotálamo son características descritas en pacientes de EA (60-62). Algunos estudios también han encontrado presencia de placas de Aβ y NFTs de tau en análisis *post mortem* de pacientes de EA en estado avanzado (291). Por este motivo, examinamos la presencia de patología amiloide en el hipotálamo de ratones 5xFAD, que podría causar una posible disfunción hipotalámica. En nuestro caso, no encontramos evidencias de placas de Aβ en secciones hipotalámicas (bregma -1,58 mm; Interaural 2,22 mm) a los 6 meses de edad en los ratones 5xFAD, así como tampoco a los 10 meses de edad, a pesar de que éstas sí eran observables en otras regiones como el hipocampo o la corteza. El hecho de que los transgenes de *APP* y *PS1* en el modelo 5xFAD sean controlados por el promotor de *Thy1* (también conocido como CD90), el cual es específico de neuronas, nos lleva a pensar que el hipotálamo podría estar generando Aβ, a pesar de no llegar a formar placas detectables mediante inmunohistoquímica. Por este motivo, no puede excluirse la posibilidad de que otras formas solubles de Aβ como la formación de

oligómeros, la cual provoca daño neuronal y provoca una activación de la microglía y astrocitos, podría ser causa de una posible alteración de la función hipotalámica.

Los trastornos metabólicos suelen estar ligados a la presencia de una respuesta inflamatoria en el hipotálamo. Numerosos núcleos del hipotálamo muestran neuroinflamación en la obesidad, y la infiltración de citoquinas exacerba la enfermedad (393). En nuestro estudio, a los 6 meses de edad encontramos un aumento de los niveles de proteína de los marcadores de reactividad de astrocitos (GFAP) y de microglía (IBA1) así como de la expresión de genes de citoquinas *Tnf* e *Il1b*. En un estudio más profundo a 10 meses de edad, encontramos un aumento de la expresión de estos genes, los cuales estaban ligados a una menor ingesta y peso corporal. Se ha descrito previamente que un aumento de los niveles hipotalámicos de *Il1b* y *Tnf* pueden promover la hipofagia, además de una disminución del gasto energético y de la sensibilidad a insulina. En general, se observa una respuesta inflamatoria en el hipotálamo ligada a un cambio en los patrones de ingesta. A los 6 meses de edad, encontramos, además, un aumento de la fosforilación de tau en hipotálamo de los ratones 5xFAD, sin llegar a promover un estado hiperfosforilado de ésta, lo que sugiere que podría haber presencia de oligómeros y formas solubles de A β desencadenando la respuesta inflamatoria (114). Otra posibilidad que no se puede descartar es la infiltración de citoquinas procedentes de la periferia en el hipotálamo, el cual se encuentra ubicado junto al cuarto ventrículo, dado que las alteraciones de la barrera hematoencefálica son característica en procesos neurodegenerativos en curso con un estado neuroinflamatorio crónico (394). Se cree que la inflamación en el hipotálamo provoca alteraciones en el metabolismo. El modelo de ratón 3xTg de EA también ha demostrado tener una elevada expresión de *Il1b*, *Tnf* e *Il6* en el hipotálamo (111, 112). Ha sido descrito que tanto IL-1 β como TNF- α participan en la alteración de la homeostasis energética en el hipotálamo, de forma que, en el ARC del hipotálamo, IL-1 β puede provocar hipofagia y disminuir el peso corporal (395), mientras que se ha visto que TNF- α en el hipotálamo puede provocar una disminución del gasto energético y resistencia a insulina (113).

En general, el hipotálamo ejerce un fino control del balance energético a través de la secreción e interacción de varios neuropéptidos. Entre ellos, la orexina aumenta el apetito y la vigilia en el contexto de la búsqueda de alimentos, y la MCH estimula el consumo de alimentos apetecibles y promueve la somnolencia. NPY y AgRP promueven el aumento de la masa corporal y estimulan el apetito, mientras que POMC y CART provocan la pérdida de peso al inhibir la ingesta de alimentos y estimular el gasto energético (396-399). La secreción de estos neuropéptidos debe estar equilibrada para regular la conducta de ingesta y la homeostasis energética general. En todo el hipotálamo, identificamos la expresión del ARNm de estos neuropéptidos.

Aunque la expresión de los neuropéptidos clave que regulan la ingesta de alimentos en el ARC y el PVN, *Npy*, *Agrp*, *Pomc* y *Cartpt*, no estaba significativamente alterada a los 6 meses de edad, ya se observaba una pérdida de la señalización hipotalámica de la insulina y la leptina en los ratones 5xFAD (400). La menor ingesta en ratones 5xFAD ha sido relacionada por otros autores con problemas neurodegenerativos y motores que dificultan la masticación (401). A los 10 meses de edad, encontramos que la expresión de *Pomc* y *Cartpt* disminuyó significativamente en los ratones 5xFAD, lo que podría ser el resultado de un deterioro de la señalización hormonal de la insulina y la leptina en el hipotálamo (402, 403). Aunque la disminución de la expresión de los neuropéptidos orexígenos *Npy*, *Agrp* y *Pmch* en los ratones 5xFAD no es tan significativa, esta situación indica la pérdida de la capacidad de gobernar la ingesta y el gasto de energía en los animales 5xFAD a una edad más avanzada. Se ha descrito que la presencia de fragmentos de A β hace que la expresión de *Npy* disminuya en cortes de cerebro de ratones Tg2576 modelos de

EA (118). Además, en este mismo modelo ya ha sido descrito una menor expresión de *Npy*, *Agrp*, *Pomc* y *Cartpt*, mientras que otro estudio en el modelo 3xTg ha puesto de manifiesto un aumento de la expresión de genes inflamatorios en el hipotálamo, los cuales estaban relacionados con menores niveles de *Agrp* y *Pomc* (63, 119). En pacientes humanos con EA, se ha observado una disminución de los niveles del neuropéptido NPY en la región de la corteza cerebral, amígdala, así como en plasma, el cual se encuentra además ligado a un efecto de neuroprotección y estrés (120-123). Sin embargo, existen escasos estudios describiendo la señalización hipotalámica de neuropéptidos en el contexto de la EA y posibles alteraciones metabólicas subyacentes. En general, en nuestro estudio encontramos que el aumento de la expresión de citoquinas, especialmente en los marcadores inflamatorios *Gfap*, *Tnf* y *Il1b* se encontraban asociados a una menor expresión de *Npy*, *Agrp*, *Pomc*, *Cartpt* en los ratones 5xFAD, asociados a su vez a una menor ingesta y peso corporal. En este sentido, también encontramos una asociación significativa entre el peso corporal y una menor expresión de irisina, el cual está ligado al gasto energético y la sensibilidad a la insulina, así como a una mayor expresión de *Igf1*, cuya expresión se encuentra elevada en el cerebro a causa del aumento de la producción de citoquinas (404, 405). Es plausible pensar que la patología amiloide subyacente podría afectar a la expresión y liberación de neuropéptidos hipotalámicos responsables del manejo de la homeostasis energética, provocando un estado neuroinflamatorio que alteraría la respuesta de las neuronas hipotalámicas como centro integrador de información del estado energético del organismo. Sin embargo, no podemos descartar que otros eventos que ocurren en la periferia puedan estar afectando y provocando una neuronifmalación hipotalámica.

6.2.3 La eficacia del DCI en la reducción de la respuesta inflamatoria en el hipotálamo y el balance energético

En anteriores trabajos, se ha evaluado el efecto del DCI en la ingesta, mayormente asociado a la resistencia a la insulina. En general, el uso del DCI y sus análogos ha mostrado resultados dispares, en tanto que en algunos casos se observa un efecto saciante a través de la activación de la ruta de Akt, disminuyendo la expresión de *Npy* en modelos animales y pacientes que padecen de resistencia a insulina u obesidad, mientras que se ha observado en ratones que en ayunas se observa el efecto contrario, aumentando la expresión de *Npy* y *Agrp*; y en otros casos no se observa un efecto neto sobre la ingesta o el peso corporal (82, 406-408). El DCI es un sensibilizante de insulina y se ha visto que actúa a través de la ruta de señalización de PP2C α , activando los canales de potasio modulados por ATP (K_{ATP}) (81, 125). El uso de fármacos como la insulina o secretagogos de ésta como las sulfonilureas, las cuales actúan a través del mecanismo anteriormente descrito, y promueven una ganancia de peso en pacientes con T2DM, a través de mecanismos asociados a un aumento de la ingesta por la modulación de K_{ATP} en el hipotálamo (409). A pesar de que se ha estudiado previamente la eficacia del tratamiento con DCI sobre parámetros de estrés oxidativo e inflamación, hasta la fecha no existen datos que relacionen la eficacia del DCI en un contexto de inflamación hipotalámica, teniendo en cuenta que ciertos eventos de inflamación hipotalámica han sido asociados a la hipofagia, así como a la hiperfagia (410).

En el trabajo de esta tesis doctoral, hemos observado que nuestro modelo animal 5xFAD presenta una inflamación hipotalámica con activación microglial y reactividad astrocítica que disminuye la expresión de los neuropéptidos *Npy*, *Agrp* y *Pomc*, derivando en la pérdida del mecanismo de regulación de la ingesta y el gasto energético, provocando hipofagia y derivando en la supresión de la ingesta y la pérdida de peso. Durante 4 meses de tratamiento, fuimos

evaluando los cambios en el peso corporal y la ingesta de los animales tratados con DCI. En los ratones 5xFAD, el tratamiento oral con DCI normalizó la ingesta al peso corporal, disminuida en los ratones 5xFAD, y elevó parcialmente el gasto energético, mayormente en las hembras 5xFAD.

Es probable que la inflamación del hipotálamo y la señalización neuroendocrina estén implicadas en el proceso por el que la DCI recupera parcialmente el apetito en los ratones 5xFAD, por lo que evaluamos el efecto del DCI en la expresión génica de neuropéptidos y citoquinas en el hipotálamo, además de la inmunorreactividad específica de GFAP astrocítica e IBA1 microglial en los núcleos hipotalámicos involucrados en el control del balance energético: ARC, VMN, PVN, DMN y LH. No observamos alteraciones en la expresión de citoquinas proinflamatorias en los animales 5xFAD tratados con DCI a pesar de que se sabe que la DCI tiene un efecto antiinflamatorio. Observamos un intrigante descenso de *Il6* por debajo de los niveles normales en los ratones 5xFAD tratados con DCI. Anteriormente se ha demostrado que la expresión de *Il6* en el hipotálamo disminuye la expresión de *Pomc* y *Npy* (411). En nuestro caso, observamos una relación inversa significativa entre *Il6* y *Agrp* en ambos sexos. Por lo tanto, el efecto de DCI sobre la expresión de la *Il6* y su posible contribución a la regulación hipotalámica de la homeostasis energética sigue sin conocerse.

A pesar de que el DCI tuvo un efecto moderado en la expresión génica de las citoquinas inflamatorias, hallamos un descenso de la expresión de *Gfap* e *Igf1* en el hipotálamo de los ratones 5xFAD, con mayor significancia en las hembras. A pesar de que IGF-1 es un factor trófico, la expresión de IGF-1 está ligada a la reactividad de astrocitos y a los niveles de GFAP, como se ha observado en isquemia y lesiones traumáticas cerebrales en roedores (404, 412, 413). En consecuencia, se observó un aumento de la expresión de los neuropéptidos orexígenos y anorexígenos hipotalámicos, a causa del descenso de la expresión de *Gfap*. El hecho de que la *Gfap* se asociara negativamente con la expresión de neuropéptidos orexígenos y anorexígenos sugiere que la activación astrogliar interfiere significativamente con la actividad neuronal hipotalámica. Además, el análisis de inmunofluorescencia reveló que la señal de GFAP estaba fuertemente asociada con el ARC y el VMN, ambos reguladores principales de la ingesta de alimentos, así como con el PVN en las hembras 5xFAD, y el tratamiento con el DCI logró disminuir la cantidad de GFAP en los núcleos hipotalámicos mencionados. Sin embargo, no se observaron cambios en la inmunorreactividad de IBA1 en el hipotálamo. Como resultado, estos hallazgos implican que la disfunción hipotalámica en los ratones 5xFAD está causada por la astrogliosis y no por la microgliosis. Es posible que la inflamación hipotalámica y la activación de astrocitos en los ratones 5xFAD sea desencadenada por la presencia de oligómeros de A β en el hipotálamo no detectados por técnicas de inmunohistoquímica. Dado que se ha observado que el DCI es capaz de disminuir la neurotoxicidad asociada a los oligómeros de A β , es posible que éste sea uno de los mecanismos por el cual el DCI restablece el control hipotalámico del balance energético.

6.3 El DCI frena el progreso del deterioro cognitivo en los ratones 5xFAD

A partir de los 6 meses de edad, los ratones 5xFAD ya mostraban defectos cognitivos en la memoria a corto plazo, como se muestran en el YM y se ha descrito previamente. A los 10 meses de edad, los ratones 5xFAD machos y hembras tratadas con DCI mostraron una mejora en el patrón de alternancia, evitando el declive progresivo de los ratones 5xFAD sin tratamiento. Junto

con la memoria de trabajo, los animales se sometieron a la prueba de MWM para evaluar los cambios específicos en la memoria de referencia dependiente del hipocampo, la memoria de lugar y la flexibilidad cognitiva, determinados por la latencia para alcanzar la plataforma en las fases visual, de adquisición y de inversión de MWM, respectivamente. Los machos 5xFAD tratados con DCI mostraron un mejor rendimiento en la fase de inversión en comparación con los machos 5xFAD sin tratamiento, demostrando una mayor flexibilidad cognitiva. Estos resultados sugieren que el tratamiento con DCI atenúa el deterioro cognitivo en tareas visoespaciales que requieren tanto memoria de trabajo como plasticidad cognitiva, específicamente en los machos. El hecho de que el DCI mostró una capacidad de mejora cognitiva superior en los ratones macho respecto a las hembras 5xFAD es probablemente debido a un inicio más temprano y agresivo de la manifestación de declive cognitivo en las hembras 5xFAD. Este hecho evidencia que, además de aminorar las alteraciones metabólicas mostradas en los ratones 5xFAD, el DCI es capaz de frenar el declive cognitivo. Es plausible pensar que la pérdida de peso y la disfunción endocrina de los ratones 5xFAD estén ligadas a la patología amiloide, la cual define el progreso de deterioro de la memoria en los ratones 5xFAD. Por lo tanto, el DCI, a través de su acción en la periferia y el sistema nervioso central, es capaz de frenar las manifestaciones cognitivas de la EA.

6.4 Los ratones 5xFAD presentan alteraciones hormonales y lipídicas en plasma ligados al sexo

Los estudios de seguimiento en humanos han puesto de manifiesto el valor predictivo de los niveles de insulina plasmática en ayunas en la EA, mostrando que los niveles de insulina basal excesivamente bajos eran mayores predictores del riesgo de desarrollo posterior de demencia y EA en comparación con los niveles de insulina elevados, independientemente del desarrollo preclínico de diabetes tipo 2 (11, 115). Esto perfila una asociación en forma de U entre los niveles de insulina plasmática en ayunas y el riesgo de desarrollar EA. En estos estudios, el menor peso corporal estaba relacionado con niveles de insulina menores en plasma (11, 115). Además de la insulina, se ha observado en pacientes con EA que los niveles bajos de insulina en plasma representan un mayor riesgo de desarrollo de demencia (414). Este hecho es probablemente relacionado al mayor riesgo de demencia de tipo EA en individuos con menor IMC en la mediana y avanzada edad, donde paradójicamente un IMC elevado es un efecto protector contra la EA. Dado que otras hormonas como GLP-1 o GIP se han postulado como terapias en la EA debido a sus efectos neurotróficos, junto a la insulina, la cual juega un amplio papel en la resistencia a insulina cerebral en la EA, decidimos determinar el estatus metabólico y hormonal en plasma de los ratones 5xFAD (415).

Además de la insulina, se ha postulado que las hormonas hipofisarias juegan un papel importante en el desarrollo de la EA, especialmente aquellas ligadas a la patología en mujeres. Existe controversia sobre el papel de los estrógenos como factores neurotróficos en la EA, de modo que la terapia de reemplazo hormonal con estrógenos en mujeres ha mostrado tanto una mejora como un empeoramiento de la capacidad cognitiva tras la menopausia (416, 417). Sin embargo, otros estudios han mostrado una mayor incidencia de la demencia de tipo Alzheimer en mujeres con niveles elevados de FSH, los cuales se incrementan durante la menopausia (308-310). Por otra parte, niveles disminuidos de hormona estimulante de la tiroides (thyroid-stimulating hormone (TSH)) en plasma (418), así como alteraciones en el eje GH-IGF-1, cuya

actividad disminuye con la edad y está asociada al envejecimiento prematuro observado en la EA (419).

Dado que, por lo general, la obesidad y la pérdida de peso se encuentran relacionados con niveles plasmáticos de TAGs y colesterol, los cuales han demostrado mostrar una relación con el riesgo de desarrollo de demencia en la EA. De hecho, el uso de estatinas, las cuales interfieren en la síntesis de colesterol en el organismo, así como de terapias orientadas a regular los niveles de LDL y HDL, han mostrado una reduciendo los problemas cognitivos mostrados por los pacientes de EA. Por todo ello, decidimos evaluar los niveles plasmáticos de las hormonas metabólicas, hipofisarias y el perfil bioquímico en plasma de los ratones 5xFAD.

6.4.1 Los ratones 5xFAD presentan niveles reducidos en plasma de secretagogos de insulina, insulina y otras hormonas y pérdida de señalización endocrina en el hipotálamo

El ratón 5xFAD mostró un declive generalizado, dependiente de la edad, en la señalización endocrina, particularmente en las hormonas asociadas a la señalización de la insulina. A los 6 meses de edad, los animales 5xFAD presentaban niveles bajos de insulina en plasma, además de alteraciones específicas en las hormonas secretagogas de insulina, GIP y GLP-1, las cuales se exacerbaban a los 10 meses de edad. Puesto que la señalización endocrina hipotalámica es esencial para la regulación del balance energético, decidimos evaluar la expresión génica y los niveles de proteína y activación de receptores endocrinos en el hipotálamo, así como el de los intermediarios de las rutas de señalización. El fenotipo metabólico de los ratones 5xFAD a los 6 meses de edad fue acompañado de una disminución de la señalización hipotalámica de la insulina, la leptina y el GLP-1, tal y como demuestra la baja actividad de los receptores de insulina y leptina y de los mensajeros secundarios IRS1 y transductor de señales y activador transcripcional 5 (*signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5)), respectivamente, así como de los sensores metabólicos mTOR, AMPK y ERK, los cuales interactúan en la ruta de señalización de sendas hormonas. En consonancia con esto, a los 10 meses de edad los niveles de expresión del receptor de insulina *Insr* se encontraban disminuidos tanto en machos como en hembras, mostrando una pérdida de señalización de insulina generalizada y progresiva en el hipotálamo de los ratones 5xFAD. Por otra parte, las hembras 5xFAD mostraron una menor expresión del receptor de leptina a los 10 meses de edad, no observado en los machos 5xFAD. Si bien los niveles bajos de insulina en plasma podrían contribuir a una activación disminuida de los receptores de insulina hipotalámicos, la menor expresión y actividad del receptor de insulina podría deberse a una pérdida de la capacidad neuronal de responder a las señales hormonales de la periferia. Este parece ser el caso con las hembras 5xFAD, las cuales muestran una respuesta disminuida a la leptina a pesar de presentar niveles plasmáticos de leptina similares a las hembras no transgénicas. Se sabe que la inflamación hipotalámica deteriora la respuesta neuronal a las señales neuroendocrinas, como la insulina y la leptina (420), y se observa en ratones con EA (421). Tanto la insulina como la leptina son importantes factores de crecimiento neuroprotectores y se ha observado que el deterioro de la señalización de la insulina, la leptina y el GLP-1 en el hipotálamo contribuye al empeoramiento de la patología A β (422).

La señalización de GIP y GLP-1 en el hipotálamo contribuye a la sensibilidad a la insulina y también proporciona un efecto neuroprotector y modula la ingesta de alimentos y el gasto energético (423, 424). Si bien los niveles bajos de GIP y GLP-1 podrían ser una de las posibles causas de los niveles disminuidos de insulina en plasma, es posible que la hipoinsulinemia

mostrada por los ratones 5xFAD sea causada por otros factores, como una respuesta hipotalámica deficiente o a la presencia de agregados de A β en el páncreas, los cuales ya se han observado en el modelo 3xTg contribuyendo a la pérdida de células β -pancreáticas y a menores niveles de insulina en plasma (116, 117). La disminución de los niveles de GLP-1, GIP y grelina se ha determinado previamente en ratones 3xTg, donde la pérdida de secreción hormonal en el tracto gastrointestinal es progresiva con la edad (425).

A pesar de presentar un menor peso corporal, los ratones 5xFAD no mostraron niveles menores de leptina en plasma, pero sí de otra de las adipoquinas secretadas en el tejido adiposo, la resistina, la cual está implicada en el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria en el cerebro y en la resistencia hipotalámica a la insulina mediante su unión a los receptores TLR4 (426-428). De hecho, la expresión de resistina hipotalámica (*Retn*), la cual ejerce un efecto paracrina, también se encuentra disminuida específicamente en hembras 5xFAD, tanto a los 6 como a los 10 meses de edad. Además, la asociación entre los niveles de resistina y el aumento de los marcadores inflamatorios en pacientes con EA sugiere un papel proinflamatorio de la resistina en la EA (429). Encontramos que los niveles plasmáticos bajos de resistina estaban positivamente relacionados con el bajo peso corporal tanto en machos como en hembras, lo que también podría deberse a la reducción de la masa grasa en los ratones 5xFAD. Si bien encontramos mayores niveles de expresión y proteína de TLR4 en el hipotálamo de los ratones 5xFAD, este receptor se encuentra ligado a respuestas inflamatorias desencadenadas por otros ligandos, lo cual explicaría la mayor actividad de TLR4 en el hipotálamo como parte del estado neuroinflamatorio observado en el hipotálamo. Dado que la infusión central de resistina modula la actividad neuronal hipotalámica y promueve la ingesta de alimentos, los bajos niveles de resistina pueden implicar un papel importante en la regulación del apetito más que en el proceso neuroinflamatorio en los ratones 5xFAD. Además, la asociación entre los niveles de resistina y el proceso neuroinflamatorio en el hipotálamo parece ir en dirección opuesta, ya que observamos una asociación negativa entre la resistina y la expresión hipotalámica de *Il1b* y *Tnf* en hembras 5xFAD, lo que sugiere una importante interacción entre la neuroinflamación hipotalámica, los niveles de resistina y la pérdida de peso observada específicamente en las hembras. Nuestros resultados parecen estar en consonancia con resultados anteriores que muestran una reducción de las fibras de resistina hipotalámicas tanto en ratones jóvenes obesos como en ratones jóvenes con falta de peso y privados de alimentos (430). De acuerdo con esto, el daño inducido al ARC, donde la resistina se colocaliza con las neuronas POMC, disminuye la inmunoreactividad de la resistina (430).

Otra hormona importante en la señalización de insulina y el control de la ingesta es la grelina. De esta forma, se observaron niveles plasmáticos menores de grelina en las hembras 5xFAD a los 6 y 10 meses de edad, aunque no se observaron cambios significativos en los niveles de proteína del receptor de grelina en el hipotálamo. La grelina también ejerce un efecto neuroprotector en la EA independientemente de la señalización de la insulina y promueve la ingesta de alimentos (431, 432). El tratamiento de ratones 5xFAD con el agonista de la grelina MK-0677 ha demostrado que disminuye la carga de A β , la neuroinflamación y la neurodegeneración en el hipocampo (433). Anteriormente se ha observado en el modelo de ratón Tg2576 de la EA que las neuronas secretoras de NPY en el hipotálamo pierden la respuesta a la leptina y a la grelina, en presencia de péptidos A β , lo cual sugiere que formas oligoméricas solubles de A β podrían estar contribuyendo a un menor control de la regulación hipotalámica de los procesos de homeostasis de energía (402).

6.4.2 Los ratones 5xFAD muestran niveles alterados de hormonas hipofisarias en plasma específicas de sexo

Actualmente existen diversos estudios prospectivos que muestran un riesgo incrementado de EA con niveles plasmáticos incrementados de FSH, alteraciones en el eje GH-IGF-1 y niveles disminuidos de TSH y ACTH (308-310, 418, 419, 434). De hecho, debido a los efectos tróficos de la GH, una de las terapias propuestas para retrasar deterioro cognitivo es la terapia con GH recombinante humana (*recombinant human GH (rhGH)*) y la GHRH estimulante de la secreción de GH, las cuales muestran resultados dispares (435, 436). Cuando se analizaron las hormonas hipofisarias, encontramos una disminución de la GH, TSH y ACTH plasmática en los machos 5xFAD, mientras que el BDNF y la FSH en plasma aumentaron en las hembras 5xFAD.

En el caso de los machos 5xFAD, no existe una razón clara para el descenso de los niveles plasmáticos de ACTH, TSH y GH específica de los machos. Previamente se ha determinado en una cohorte de pacientes de EA niveles inferiores de TSH, asociados a factores de riesgo cerebrovascular, cuya causa podría deberse al patrón neurodegenerativo de la EA, afectando a la capacidad hipofisaria para secretar hormonas, o a una respuesta hipofisaria disminuida a la hormona liberadora de tirotrópina (*thyrotropin-releasing hormone (TRH)*) (437). Sin embargo, este estudio fue realizado tanto en hombres como en mujeres, por lo que no explica la especificidad de la disminución de TSH hipofisaria en los ratones macho 5xFAD. Por otra parte, se han encontrado defectos en el eje GH-IGF-1 de pacientes con EA, aunque mayormente asociados a IGF-1. La GH es esencial para estimular la producción de IGF-1, de forma que la pulsatilidad y respuesta a GHRH de las neuronas que liberan GH disminuye con la edad, lo cual podría estar relacionado con un envejecimiento prematuro. (438). La pérdida de sensibilidad hipofisaria a estímulos hormonales provenientes del hipotálamo podría ser la causa de los niveles disminuidos de ACTH observados en los ratones macho 5xFAD. Previamente hemos observado una reducción en la expresión de *Pomc* hipotalámica, especialmente en los ratones macho 5xFAD. Dado que la ACTH es un subproducto del procesamiento de POMC, es también posible que los niveles plasmáticos disminuidos de ACTH se deban a una menor producción de POMC hipofisaria.

En el caso de las hembras 5xFAD, estudios prospectivos ya han mostrado que los niveles elevados de FSH en plasma en mujeres son indicativos de mayor riesgo de EA (308-310). El aumento de la secreción de FSH es una respuesta a la anovulación producida durante la perimenopausia, por tanto es posible que los niveles elevados de FSH en plasma de las hembras 5xFAD se deban a una pérdida de fertilidad (439). Asimismo, se ha observado en mujeres posmenopáusicas que los niveles elevados de FSH se asocian negativamente con niveles bajos de insulina basal, observados en los ratones 5xFAD (126). Debido a la relación entre los niveles elevados de FSH con la incidencia de demencia y EA en mujeres durante la peri-menopausia, el aumento de FSH plasmático podría suponer un marcador de envejecimiento prematuro en las hembras 5xFAD. Por otra parte, la elevación del BDNF en las mujeres 5xFAD es paradigmática, ya que se han encontrado resultados contradictorios respecto a la concentración de BDNF en plasma en el deterioro cognitivo, pero se han observado previamente niveles elevados de BDNF en pacientes con EA moderada, probablemente asociados a una reacción de estrés e inflamación (440). Dado que encontramos una asociación significativa entre los niveles plasmáticos de BDNF con la expresión hipotalámica de *Gfap* e *Igf1*, es plausible pensar que BDNF participe en la respuesta inflamatoria de las hembras 5xFAD.

6.4.3 El perfil lipídico plasmático se encuentra alterado en los ratones 5xFAD

El hecho de que la obesidad y los problemas cardiovasculares sean predictivos de una mayor incidencia de EA ha llevado a múltiples estudios longitudinales que relacionan los niveles plasmáticos de TAGs, colesterol o proteínas lipídicas con la aparición de síntomas o la prevalencia en la EA. Se ha demostrado que unos niveles elevados de colesterol o LDL y unos niveles bajos de HDL contribuyen al riesgo de padecer EA, debido a los cambios en la estructura de la membrana de las neuronas y a la acumulación y procesamiento de fragmentos amiloides (441, 442). Sin embargo, los resultados generalizados siguen siendo controvertidos, ya que otros estudios muestran que la terapia lipídica que aumenta los niveles de LDL y disminuye los de HDL en pacientes con EA promueve mejores puntuaciones en las pruebas cognitivas (443). En cuanto a los estudios en animales, se ha mostrado una distribución de lípidos alterada en el cerebro de ratones 5xFAD junto con la patología A β (444, 445).

En nuestro estudio encontramos una disminución de los niveles de TAGs en plasma en los ratones 5xFAD principalmente en las hembras a 6 meses de edad y en ambos sexos a 10 meses de edad, junto a una disminución de colesterol plasmático en machos 5xFAD a los 10 meses de edad. Estos resultados son similares a otro estudio que mostraba bajos niveles plasmáticos de TAGs y colesterol total en los machos y hembras 5xFAD a los 12 meses de edad. Mientras que este estudio también mostraba una disminución de HDL y LDL en los machos, nosotros no encontramos diferencias significativas en los ratones 5xFAD (446). La disminución de los niveles de TAG y colesterol en los animales 5xFAD puede ser consecuencia de un menor contenido de grasa en el tejido adiposo, como se ha descrito previamente (447). De hecho, en aquellos estudios prospectivos que mostraban el riesgo incrementado de EA en pacientes con niveles bajos de insulina en plasma y menor IMC y aquellos que mostraban una pérdida de peso, se ha encontrado que los aquellos pacientes con niveles inferiores de insulina muestran unos niveles menores de TAGs en plasma, mientras que existe una asociación significativa entre la pérdida de peso y los niveles de TAGs plasmáticos, así como una tendencia a también, disminución del colesterol total en plasma (11, 124). En un análisis correlativo encontramos una asociación estrecha entre los niveles plasmáticos de insulina, TAGs y la expresión de genes hipotalámicos de inflamación y neuropéptidos, confirmando que el modelo 5xFAD muestra una alteración de los parámetros metabólicos en la periferia relacionada con aquellos mecanismos que derivan en la pérdida de peso. No podemos descartar que otra posible causa de la disminución de niveles plasmáticos de lípidos sea debido a un cambio de tendencia hacia la β -oxidación lipídica preferentemente como fuente de energía respecto a los carbohidratos, de acuerdo con la disminución de la RQ observada en los ratones 5xFAD, ya que las mediciones de RQ más bajas se correlacionan con un mayor consumo de O₂ en la β -oxidación de los lípidos.

6.4.4 La eficacia del DCI en la normalización de los niveles de hormonas y lípidos en plasma en los ratones 5xFAD

Uno de los principales factores que se encuentra asociado al desbalance metabólico de los ratones 5xFAD es la disminución de los niveles plasmáticos de insulina y de la señalización de insulina en el hipotálamo, de forma que la concentración de insulina en plasma se encuentra asociada a la inflamación hipotalámica y la ingesta. Además de la insulina, tanto GIP como GLP-1, que estimulan su secreción, también han mostrado niveles disminuidos en plasma en los ratones 5xFAD, asociados a los cambios metabólicos anteriormente descritos.

La capacidad del DCI de normalizar los niveles de insulina en plasma de los ratones 5xFAD puede deberse a diversos factores. Hay estudios que indican que el DCI, además de ser un sensibilizante de la insulina y disminuir el requerimiento de insulina durante la ingesta, es capaz de promover la actividad de las células β -pancreáticas y estimular la liberación de insulina a través de la ruta de señalización de PP2C α , activando los canales de potasio modulados por potasio (K_{ATP}) (81, 125). De hecho, su uso es sinérgico junto al de las sulfonilureas para estimular la secreción de insulina, de forma que el DCI actúa a través de varios mecanismos complementarios para mantener la secreción de insulina. A pesar de que no hemos estudiado la patología amiloide en el páncreas de los ratones 5xFAD, se sabe que la APP se expresa en el páncreas humano y murino y otros estudios en el modelo 3xTg han mostrado acumulación de A β en los islotes pancreáticos además de una pérdida de la masa de células pancreáticas, derivando en una pérdida de la secreción de insulina que se produce antes de que se formen las placas de A β , sugiriendo que la formación temprana de oligómeros en el páncreas (65, 296). De hecho, la formación de sAPP induce la secreción de insulina, por lo que el procesamiento aberrante de APP hacia A β podría estar disminuyendo la capacidad de secreción de insulina. Otro de los mecanismos por el cual el DCI podría estar restaurando la secreción de insulina es impidiendo la unión de los oligómeros de A β a las células pancreáticas, conservando la funcionalidad de del islote pancreático, o previniendo el daño celular causado por el estrés oxidativo, como se ha mostrado previamente en islotes pancreáticos de ratas inyectadas con STZ y ratones modelos de diabetes (1, 448-450). Este hecho es plausible, debido a que no encontramos diferencias significativas en los niveles plasmáticos de glucagón, cuya liberación no se ve afectada por sAPP (296).

Dado que la secreción de insulina también depende de la acción de secretagogos como GIP y GLP-1, liberados en las células K (GIP) y L (GLP-1) del tracto gastrointestinal, es plausible pensar que la normalización de los niveles plasmáticos de ambas hormonas, las cuales se mostraban disminuidas en el plasma de los ratones 5xFAD, pueda contribuir a la restauración de la señalización de insulina. A pesar de que no existen estudios previos que relacionen el DCI con la secreción de los péptidos gastrointestinales, se ha determinado previamente también que existe acumulación de A β en el tracto intestinal, y que los ratones 3xTg muestran una pérdida de la liberación de GIP, GLP-1 y grelina en edades avanzadas (116, 117). En nuestro trabajo, el DCI fue capaz de normalizar los niveles de GIP y GLP-1 en plasma de los ratones 5xFAD, por lo que es posible pensar que el DCI sea capaz de aminorar la respuesta de inflamación y estrés oxidativo causada por la acumulación de A β en el tracto gastrointestinal, la cual podría estar afectando a la capacidad de las células K y L en la secreción de GIP y GLP-1. Los ratones 5xFAD muestran presentan un microbiota alterado a edades avanzadas (451), lo que podría estar alterando la secreción de GIP y GLP-1, la cual se correlaciona con la presencia de ciertas familias bacterianas y se ve afectada por procesos inflamatorios intestinales (452). Estudios anteriores han mostrado que la suplementación con el análogo del DCI, el DPIN, restaura el microbiota intestinal y la abundancia de bacterias asociadas al control glucémico en ratas diabéticas, por lo que la suplementación con DCI podría inferir en el microbioma de los ratones 5xFAD en un mecanismo que implica la producción deficiente de GIP y GLP-1. En nuestra patente para el uso del DCI como compuesto para el tratamiento de taupatías, hemos determinado que el DCI y su análogo DPIN son capaces de estimular la liberación de grelina en las células enteroendocrinas del tracto gastrointestinal. A pesar de que sólo se encontró una disminución de grelina plasmática en las hembras 5xFAD a 6 meses de edad, mientras que a los 10 meses de edad los niveles de grelina en plasma se encontraban normalizados, sin mostrar ningún efecto del DCI en el aumento de sus niveles plasmáticos, probablemente debido a su capacidad estimuladora en dosis agudas, en tanto que los ratones fueron sacrificados tras horas de ayuno (110).

El DCI es prescrito actualmente para trastornos de fertilidad y PCOS, además de producir un efecto positivo en la ovulación al restaurar los niveles plasmáticos de FSH y LH alterados, así como la producción de esteroides sexuales. Los niveles elevados de FSH se encuentran asociados negativamente a niveles bajos de insulina plasmática en la menopausia, por lo que es el DCI podría regular los niveles de FSH en relación a los de insulina (126). En un estudio de farmacocinética recientemente publicado por nuestro grupo, se mostró que la administración aguda de DPIN en humanos tiene a bajar de forma no significativa los niveles de FSH plasmáticos, lo que apoya el hecho de que el DCI podría revertir los niveles elevados de FSH, indicativos de un envejecimiento prematuro en las ratonas hembra 5xFAD (127). Dado que la BDNF se encontraba asociada a la respuesta inflamatoria observada en el hipotálamo (específicamente con GFAP), es posible que la reducción de BDNF plasmática asociada al tratamiento con DCI en las ratonas hembra 5xFAD sea derivado de su actividad antiinflamatoria.

Una de las características más definidas del DCI es su capacidad de reducir los niveles excesivamente elevados de TAGs y colesterol en plasma en pacientes con resistencia a insulina y obesidad (453). El hecho de que el DCI aumentó los niveles de TAGs plasmáticos excesivamente bajos en los ratones 5xFAD puede deberse al aumento del peso corporal y a una mayor deposición de grasa en el tejido adiposo. Esto también podría deberse a un aumento de los niveles de insulina plasmática, la cual influencia en la deposición y tráfico de TAGs en el tejido adiposo. A modo de resumen, el tratamiento con DCI mostró eficacia al normalizar los niveles alterados de hormonas involucradas en la señalización de insulina, procesos inflamatorios y fertilidad de las hembras 5xFAD. Estos hechos podrían estar ligados a la efectividad del DCI a la hora de revertir la pérdida de peso progresiva en los ratones 5xFAD.

6.5 Alteraciones metabólicas en el hígado de los ratones 5xFAD

Cada vez hay más estudios observacionales que relacionan la patología hepática con niveles elevados de A β y riesgo de Alzheimer. La proteína A β en plasma se encuentra mayormente asociada a proteínas ricas en triglicéridos, como la VLDL y los quilomicrones, así como a la lipoproteína APOE (454). En el hígado, la proteína A β se une a receptores de lipoproteínas como LRP1 (presente en la barrera hematoencefálica), VLDLR o LDLR, tras lo cual es internalizado y eliminado a través de su degradación o siendo excretada a través del conducto biliar (315, 316). La sobreexpresión de APP humana en el hígado de ratones genera una acumulación de grasa en el hígado, además de producir deterioro cognitivo, por lo que la acumulación de A β en el hígado podría interferir en el metabolismo lipídico. Debido a que encontramos niveles elevados de GOT y GPT en los ratones 5xFAD, específicamente en hembras a 6 meses de edad y tanto en hembras como en machos a los 10 meses de edad, junto a niveles alterados de TAGs y colesterol en plasma, decidimos evaluar el estatus metabólico del hígado en relación con posibles alteraciones debido a la patología amiloide.

6.5.1 Las hembras 5xFAD muestran patología amiloide exacerbada asociada a la acumulación de ácidos grasos en el hígado

En un análisis del contenido graso total en el hígado de los ratones 5xFAD a los 10 meses de edad, se encontró que las hembras 5xFAD mostraban un fenotipo de hígado graso que no presentaban los machos 5xFAD. Por ello, decidimos evaluar estudiar el metabolismo hepático

en específicamente en las hembras 5xFAD. Curiosamente, en nuestro modelo, la acumulación de ácidos grasos se asoció con una disminución de los niveles de insulina en plasma, pero a su vez con un aumento de la FSH y el BDNF en plasma. La resistencia a la insulina es una de las características mostradas en la lipodistrofia, donde se produce una distribución de la grasa ectópica fuera del tejido adiposo blanco, debido a una actividad deficiente de la lipasa sensible a hormona (*hormone-sensitive lipase* (HSL)), la cual es activada por la insulina en el tejido graso, derivando en una acumulación de ácidos grasos en el hígado (128). Se ha demostrado que existe una asociación entre los niveles de FSH en plasma y la prevalencia de hígado graso (129), mientras que por otra parte, los niveles elevados de FSH promueven la lipogénesis a través de la activación de PPAR- γ (130). El análisis de expresión génica mostró un incremento en las enzimas ligadas a la β -oxidación y peroxidación mitocondrial, indicativo de un mecanismo de respuesta para la eliminación de lípidos acumulados excesivamente en el hígado. Además, la expresión de genes involucrados en la gluconeogénesis se encontraba disminuida, derivando en la producción de acetil-CoA como sustrato para la oxidación de ácidos grasos, mientras que la vía de desaturación de ácidos grasos estaba disminuida.

En un análisis histoquímico, pudimos observar la presencia de placas amiloides en el hígado de los ratones 5xFAD, de forma que un conteo mayor de placas amiloides estaba directamente asociado con una mayor acumulación de ácidos grasos en las hembras 5xFAD, así como a menores niveles de insulina en plasma. La señalización de insulina se encuentra disminuida en el hígado de los ratones 5xFAD, y que ésta promueve la eliminación de A β (318), sugiriendo que la acumulación de proteína A β interfiere directamente en el metabolismo hepático en el modelo 5xFAD, agravando los defectos metabólicos previamente observados.

6.5.2 La eficacia del DCI en la disminución de los niveles de ácidos grasos y la patología amiloide en el hígado de las hembras 5xFAD

El tratamiento con DCI ha mostrado un efecto hepatoprotector, capaz de disminuir el estrés oxidativo e inflamación en el hígado, además de disminuir la acumulación de ácidos grasos a través de la ruta de señalización de la insulina (132-135). Dado que los niveles plasmáticos anormalmente bajos de insulina se encontraban relacionados con la acumulación de ácidos grasos en el hígado, e forma similar a como ocurre en la deposición ectópica de grasas en ratones modelos de T1DM (131), observamos que la administración con DCI incrementó la activación del receptor de insulina (I $r\beta$) y su segundo mensajero (IRS1) en el hígado de las hembras 5xFAD, lo cual se encontraba asociado a un menor contenido de grasa hepática. Además, el análisis de conteo de proteína amiloide en el hígado mostró que las hembras 5xFAD tratadas con DCI presentaban un número menor de placas amiloides, lo que sugiere que el DCI interfirió en la acumulación de placas de A β , posiblemente a través de la resensibilización a la insulina. Además, el análisis de expresión génica mostró una reducción de la respuesta inflamatoria hepática, así como del estrés oxidativo en el hígado, asociado a los niveles de ARNm de *Tnf* y los niveles plasmáticos de GPT y GOT. Aunque el DCI puede prevenir la toxicidad causada por la unión de oligómeros de A β difusibles en las neuronas *in vitro*, no se han realizado estudios sobre su eficacia en la eliminación sistémica de A β . En consecuencia, futuras investigaciones sobre este tema podrían describir un mecanismo potencial para prevenir la inflamación sistémica y la toxicidad causada por la enfermedad de Alzheimer. Dados nuestros resultados, en general, el tratamiento con DCI es capaz de restaurar parcialmente el flujo metabólico en el hígado de las hembras 5xFAD.

6.6 Alteraciones microestructurales en el fémur de los ratones 5xFAD

La densidad y estructura ósea se ven alteradas durante el envejecimiento, de forma que los huesos se vuelven más frágiles y pueden romperse más fácilmente. Los pacientes con EA presentan un riesgo incrementado de fractura, mientras que la osteoporosis es un factor de riesgo respecto al desarrollo de demencia de tipo Alzheimer, especialmente en las mujeres (136, 137). Los modelos animales de EA, especialmente aquellos con mutaciones asociadas a APP y PS1 suelen presentar un fenotipo de tipo osteoporótico (69). Además, existe una relación entre la pérdida neuronal en hipotálamo y núcleo del rafe dorsal y la pérdida de densidad ósea (70, 140, 300, 301). Las personas que presentan T1DM muestran mayor riesgo de fracturas debido a alteraciones en la densidad del hueso, por lo que estos mecanismos, los cuales se dan en el ratón 5xFAD, podrían implicar una posible alteración en la microarquitectura ósea que podría verse exacerbada en las hembras (455).

6.6.1 Los ratones 5xFAD muestran alteraciones de la estructura ósea revertidas parcialmente por el tratamiento con DCI

A lo largo de los años, los huesos experimentan una serie de cargas en diferente intensidad y fuerza a las cuales se adapta remodelando su estructura, alterando su densidad ósea a través de la resorción y formación de nuevo tejido óseo. Durante las primeras fases de la osteoporosis, se produce una resorción ósea de las trabéculas, mientras que en los estadios más avanzados de la osteoporosis, se produce una pérdida de la masa cortical del hueso, la cual se vuelve más porosa (138, 456). El desarrollo de técnicas de imagen no invasivas como el micro-CT permite evaluar la microestructura trabecular y cortical del hueso a partir de un análisis tridimensional de las diferentes capas que componen el hueso (457). El fémur es un hueso largo que permite diferenciar los cambios en la microestructura ósea producidos a partir de los procesos de remodelación que ocurren durante el envejecimiento. Por lo tanto, decidimos evaluar el fenotipo osteoporótico de los ratones 5xFAD a 10 meses de edad mediante micro-CT en los fémures de dichos animales.

El análisis de micro-CT mostró esencialmente una pérdida de fracción de volumen óseo de las trabéculas, la cual está asociada a la fuerza y rigidez del hueso, lo cual sugiere que el fémur de los ratones 5xFAD es más frágil y presenta un riesgo incrementado de fractura, confirmando los resultados mostrados en otros modelos de EA. Además, existen alteraciones evidentes en la estructura de las trabéculas, de forma que los ratones mostraban un menor número de trabéculas y mayor separación entre ellas. Las hembras 5xFAD mostraron las alteraciones estructurales más evidentes, de forma que el grosor trabecular también era menor en las hembras, mientras que en los machos 5xFAD mostraron una tendencia de mayor grosor trabecular. La pérdida de fracción de volumen óseo, número de trabéculas y la mayor separación entre éstas en el fémur es una de las características observadas durante los procesos de envejecimiento en el fémur, evidenciando un fenotipo osteoporótico en las hembras 5xFAD (138). Los cambios en la estructura tridimensional y la interconexión de las trabéculas en los huesos es un indicativo de envejecimiento y estos cambios derivan en una mayor susceptibilidad a fractura por fuerzas de torsión y compresión (138). Previamente se ha mostrado en las hembras de un modelo de ratón transgénico para APP y PS1 (B6C3-Tg) una disminución de el

volumen óseo, número y grosor de trabéculas y mayor separación entre éstas, de forma similar a los resultados obtenidos en nuestro estudio, a 9 meses de edad, pero no a los 6, indicando un inicio de la alteración estructural ósea tardía (458). Esta alteración se encontraba asociada a un aumento de los niveles de TNF- α e IL-1 β en plasma, lo que indica que el estado inflamatorio del organismo es un componente importante de las alteraciones metabólicas como la pérdida de masa ósea. La similitud entre nuestro modelo 5xFAD de EA y otros modelos murinos de EA sugiere que la patología amiloide afecta directa o indirectamente a la estructura ósea, de forma que se produce una pérdida de la masa trabecular más evidente en las hembras.

Las hembras 5xFAD, pero no los machos, también experimentaron cambios en la composición cortical del fémur, mostrando un menor área y grosor cortical. Este proceso es indicativo de la osteoporosis en estadios más avanzados, donde se incrementa el riesgo de fractura derivado de la pérdida de fuerza y grosor de la corteza del hueso, lo que confirma que las hembras 5xFAD presentan un fenotipo osteoporótico a 10 meses de edad, similar al mostrado en ratones hembra que sobreexpresan APP y PS1 (458).

A pesar de que no existen evidencias suficientes de acumulación patológica de A β en el hueso de pacientes de EA, se ha observado que la expresión de genes relacionados con la EA como APP en el hueso de pacientes de EA está asociado con la expresión de genes implicados en la resorción ósea, sugiriendo un patrón común entre la neurodegeneración y la pérdida ósea, a través de la patología amiloide (139). Además, la presencia de proteína A β inhibe la proliferación de osteoblastos *in vitro*, encargados de la deposición de nueva matriz ósea, mientras que facilitan la activación de osteoclastos mediante la activación de rutas de NF- κ B, ERK, ligando de receptor activador para el NF- κ B (*ligand of receptor activator of NF- κ B* (RANKL)), factor nuclear de células T activadas c1 (*nuclear factor of activated T cells c1* (NFATc1)) y la oscilación de calcio (140, 141). Estos estudios refuerzan la idea de que la patología amiloide, bien mediante la formación de oligómeros solubles de A β directamente en el hueso, o bien mediante la llegada de A β a través del torrente sanguíneo, podría interferir en la remodelación ósea y provocar el desarrollo de osteoporosis, incrementando el riesgo de fracturas observado en los pacientes de EA. El hecho de que hayamos observado cambios microestructurales mayormente en las hembras 5xFAD sugiere que existe un mecanismo de susceptibilidad específico del sexo que podría estar ligado a cambios hormonales. De hecho, en estudios poblacionales se ha observado un incremento de los niveles de FSH en plasma en mujeres que presentan osteoporosis durante la menopausia (459). De hecho, los niveles elevados de FSH incrementan el riesgo de osteoporosis, mientras que la FSH promueve la expresión de genes ligados a la resorción ósea mediada por osteoclastos, lo que sugiere que el fenotipo osteoporótico de las hembras 5xFAD y las pacientes de EA podría estar ligado a un envejecimiento metabólico prematuro (459, 460). Una diferencia significativa del modelo 5xFAD no mostrada en otros modelos animales de EA es que las hembras 5xFAD presentan una menor longitud del fémur, comparado con las hembras no transgénicas. Este hecho es intrigante, debido a que supone un defecto en el crecimiento óseo, el cual se produce mayormente durante la adolescencia. Debido a que durante esta etapa aún no se observan cambios a nivel cognitivo ni aparición de depósitos de placas A β , es posible que la formación de oligómeros de A β en el hueso afecten al desarrollo temprano de éste.

6.6.2 La eficacia del DCI en la prevención del fenotipo osteoporótico en los ratones 5xFAD

En nuestro modelo animal de 5xFAD, la suplementación con DCI desde los 6 hasta los 10 meses de edad ha sido capaz de revertir la pérdida de masa ósea trabecular y cortical en las hembras 5xFAD, normalizando los parámetros de microestructura ósea a aquellos mostrados por las hembras no transgénicas. Previamente se ha descrito que la administración del DCI, así como de su análogo DPIN, son capaces de inhibir la actividad de los osteoclastos a través de la actividad de las proteínas RANKL y NFATc1 y reducir la tasa de resorción ósea *in vitro* (102, 103). La actividad de los osteoclastos se ve influenciada por la presencia de factores inflamatorios como TNF- α , los cuales activan la ruta de RANKL, por lo que la capacidad antiinflamatoria del DCI podría contribuir a la disminución de la tasa de resorción ósea (461). Por otra parte, la capacidad de inhibir la unión de oligómeros de A β a la superficie celular mostrada por el DCI podría influir en la activación de los osteocitos (1, 140, 141). Además, el hecho de que DCI inhiba la actividad de los osteoclastos a través del bloqueo de RANKL, la cual es activada por la presencia A β , sugiere que el DCI podría reducir la tasa de resorción ósea mostrada en la patología amiloide.

La deficiencia de insulina, como la que ocurre en pacientes con T1DM, provoca cambios estructurales en el hueso que derivan en un fenotipo osteoporótico (455). Por ello, evaluamos la asociación entre los niveles de insulina plasmáticos y los parámetros de estructura trabecular y cortical del fémur de los ratones 5xFAD, encontrando una asociación positiva entre la insulina y el número de trabéculas, así como con el área y grosor cortical del fémur. Es posible que la eficacia del tratamiento del DCI en la prevención del fenotipo osteoporótico de las hembras 5xFAD sea mediada por la resensibilización de la señalización de insulina, la cual promueve el crecimiento óseo y la formación de osteocalcina, la cual a su vez estimula la secreción de insulina (142). Debido a que el DCI mostró un efecto específico en las hembras 5xFAD, es plausible pensar que la disminución de los niveles excesivamente elevados de FSH en las hembras 5xFAD mediado por el tratamiento con DCI sea otra de las posibles explicaciones de la eficacia mostrada por el DCI a la hora de revertir las alteraciones microestructurales específicas de sexo.

Se ha observado que existe una asociación entre la degeneración y pérdida neuronal en el hipotálamo y el núcleo del rafe dorsal con el metabolismo óseo y la prevalencia de osteoporosis. En el ARC del hipotálamo, la interacción de neuropéptidos como AgRP y POMC promueven la remodelación y el incremento de densidad ósea, a través del sistema nervioso simpático (143). Teniendo esto en cuenta, el DCI podría inhibir la resorción ósea a través del aumento de los niveles de expresión de *Agrp* en el hipotálamo observado en los ratones 5xFAD. En general, estos resultados sugieren que el DCI podría ser un tratamiento prometedor para la osteoporosis en la EA.

6.7 Limitaciones del estudio

En el estudio de este trabajo, se han encontrado una serie de limitaciones metodológicas y temporales que han limitado la traslación de los resultados. La mayoría de los casos de EA son de origen esporádico. Por esta razón, la gran mayoría de los estudios sobre la EA, incluyendo el peso corporal y los trastornos hormonales, se describen en pacientes con EA esporádica. Los modelos animales de la EA, como el ratón 5xFAD, reproducen los acontecimientos de la EA expresando formas mutantes de las proteínas humanas APP y PSEN1, descritas en la EA familiar. Estos modelos animales intentan reflejar lo más fielmente posible la patología humana de la EA (aparición de placas neuríticas A β y la formación de NFTs de tau de forma secuencial en el cerebro, distrofia sináptica, activación glial y muerte neuronal) aunque su origen no sea esporádico.

Existen modelos de EA esporádico, como las ovejas, cabras, perros o el degú de la Patagonia. Sin embargo, su uso se encuentra limitado por cuestiones éticas, dado que estos animales presentan características cognitivas que hace que requieran de un tratamiento especial, requerimientos de compañía, mantenimiento, capacidad de sufrimiento y alteraciones biológicas por estados de estrés al ser sometidos a experimentos, además de su gran tamaño y dificultad de mantener un número elevado de animales en una facilidad animal y su esperanza de vida, elevando los costes y el tiempo esperado para obtener resultados en el proceso de investigación.

Entre los modelos que portan mutaciones de EA características de la EA familiar se encuentran el ratón 5xFAD y el ratón 3xTg, los cuales son los más ampliamente utilizados en los estudios recientes de la EA. El uso de ratones presenta la ventaja con respecto a otros animales como su costo bajo de mantenimiento, la adaptabilidad a espacios reducidos, son fácilmente manejables, son similares fisiológicamente a los humanos y una esperanza de vida menor, lo cual acelera la recopilación de resultados en experimentación. En este trabajo se escogió el ratón 5xFAD debido a su capacidad para reproducir la patología amiloide fielmente (asociada a los transgenes humanos introduciendo mutaciones en *APP* y *PS1*) y a datos previos que sugerían que presentaba alteraciones fisiológicas similares a las observadas en pacientes con EA. No obstante, una desventaja de este modelo es la ausencia de formación de NFTs de tau, dado que no existe ningún modelo ratón de EA de taupatías sin mutaciones en el gen *MAPT* de tau. Los ratones 3xTg cuentan con una mutación en *MAPT*, además de *APP* y *PS1*, lo cual deriva en la formación de NFTs de tau y lo convierte en un candidato para posteriores estudios involucrando el uso de DCI y DPIN en la hiperfosforilación de tau, para lo cual existen resultados previos. No obstante, este modelo no está exento de limitaciones, dado que porta una mutación en *MAPT* que nunca se ha detectado en pacientes de EA familiar, además de no observarse una muerte neuronal en patrón definido en este modelo animal. Por ello, a pesar de las limitaciones del uso del ratón 5xFAD, se escogió este modelo como sujeto de estudio debido a las facilidades y fidelidad con el modelo humano que presenta.

En nuestro estudio de caracterización metabólica, los animales fueron enjaulados de forma individual a partir de los 6 meses de edad (inicio del estudio), permaneciendo en la misma sala. Los ratones son animales gregarios y la separación de los hermanos de camada genera estrés. No obstante, la separación de estos animales fue necesaria para realizar las diferentes pruebas de ingesta, recopilación de datos de gasto energético en las cajas metabólicas y asegurar la bebida del compuesto DCI disuelto en agua. Se intentó controlar el posible impacto del aislamiento de los animales en las condiciones más adecuadas posibles.

Debido a que el diseño experimental contemplaba el tratamiento con DCI desde una edad de 6 meses, al inicio de algunos síntomas cognitivos, hasta los 10 meses de edad, donde el deterioro cognitivo es significativo, se planteó la administración del DCI disuelto en las botellas de bebida, calculando la media cantidad de líquido bebido de agua por los animales 5xFAD de forma diaria y evaluando una posible animadversión a la ingesta del DCI, de sabor ligeramente dulce. Este método de administración de DCI ya ha sido utilizado en otros estudios donde se ha evaluado la capacidad antioxidante del DCI y la señalización de insulina en el hipotálamo (133, 462). Si bien este método de administración reproduce la ingesta de suplementos alimenticios en humanos y promueve la administración del DCI durante la bebida y la ingesta, donde se produce una respuesta de insulina, no se puede determinar ni controlar que la ingesta del DCI en los animales sea la misma durante todos los días.

A pesar de que en el análisis histológico del hipotálamo de los ratones 5xFAD no mostró acumulación de placas amiloides a los 6 y 10 meses de edad, cuando ya se ha producido un desbalance metabólico pronunciado, no se puede descartar la presencia de formas solubles de A β como oligómeros, los cuales presentan una gran toxicidad y que podrían derivar en la inflamación hipotalámica. En nuestro caso, encontramos sobreexpresión de los genes humanos *APP* y *PS1* en el hipotálamo. Recientemente se han diseñado y evaluado formas de medir la presencia de oligómeros, mediante la técnica de ELISA y mediante espectroscopía y fluorescencia que permitirían tener una idea más aproximada de la patología amiloide en el hipotálamo de los animales 5xFAD (463, 464).

El estudio fisiológico reflejó una pérdida de peso en los animales 5xFAD, asociada a un incremento en el metabolismo de lípidos en la periferia (aumento del cociente respiratorio y mayor consumo de oxígeno en procesos de oxidación lipídica, además de señalización deficiente de insulina en plasma y metabolismo de glúcidos disminuido). Se ha descrito previamente que los ratones 5xFAD presentan un menor almacenamiento de grasa en el tejido adiposo blanco. A pesar de que se realizaron estudios de bioimpedancia en los animales 5xFAD que sugieren una disminución del tejido graso en los animales 5xFAD, el número de animales utilizados para este experimento fue reducido, debido a la necesidad de anestesia y período de recuperación posterior en este ensayo, lo cual dificultaba la realización de pruebas de comportamiento y metabolismo posteriores en estos animales. Por tanto, aún son necesarios estudios posteriores que indiquen si la pérdida de peso en los animales 5xFAD está asociada a una disminución del tejido graso, o si la masa magra también se encuentra afectada en un posible estado distrófico similar al que se da en el envejecimiento. La falta de estos datos limita las conclusiones obtenidas después de la ganancia de peso observada en los ratones 5xFAD tratados con DCI, dado que se ha observado *in vitro* que el DCI estimula la lipogénesis, si bien su actividad también podría estar ligada a un mecanismo trófico similar al de la insulina en el músculo esquelético.

Además, se realizó un estudio de la microarquitectura ósea en los ratones 5xFAD mediante micro-CT, el cual evidenció una pérdida de volumen cortical del fémur y una alteración estructural de las trabéculas, asociadas a una disminución de la señalización de insulina y más pronunciada en hembras 5xFAD. El uso del DCI revirtió la pérdida ósea cortical y trabecular, aunque no logró revertir la disminución del grosor de las trabéculas en las hembras 5xFAD. Si bien estos datos ponen de manifiesto una alteración estructural ósea en los ratones 5xFAD, la cual refuerza la asociación entre la osteoporosis y la EA, aún son necesarios estudios complementarios para determinar la relación entre la BMD, el riesgo de fractura y posibles alteraciones químico-orgánicas del hueso con la EA. Además, aún se hace necesario estudiar la

posible presencia del péptido A β en el hueso, el cual ha mostrado *in vitro* capacidad de estimular la resorción ósea.

6.8 Perspectivas de futuro

La perspectiva del uso del DCI como tratamiento para la EA nace de la necesidad de encontrar nuevas vías para el tratamiento de la enfermedad. El DCI es un compuesto que se incorpora en la dieta cuando se ingieren productos vegetales como la soja o la algarroba y es esencial para la señalización de insulina en el organismo. Su estructura química está bien definida, su administración es fácil y segura y se obtiene a partir de fuentes naturales y renovables sin necesidad de síntesis química. Estas ventajas son un gran argumento para continuar con el estudio del DCI y sus análogos para el tratamiento de aquellas patologías en las que ha mostrado un potencial efecto positivo. En la actualidad, hay varios ensayos clínicos entorno al uso del DCI en la diabetes tipo 1, diabetes gestacional, infertilidad, síndrome de ovario poliquístico o endometriosis, lo cual demuestra una clara traslación de los estudios del DCI a la clínica.

Nuestros resultados preliminares del uso del DCI en el modelo 5xFAD muestran un efecto positivo en el desarrollo de alteraciones en el metabolismo propias de un envejecimiento prematuro. El DCI ha mostrado la capacidad de incrementar los niveles de insulina, GIP y GLP-1 en plasma. La capacidad del DCI de estimular la liberación de insulina ya ha sido descrita previamente. En trabajos anteriores hemos comprobado que el DCI es capaz de estimular de forma aguda la secreción de grelina en el tracto gastrointestinal. Dada la novedad de estos resultados, en futuros estudios se debería investigar el mecanismo a través del cual el DCI produce la estimulación de la secreción hormonal para evaluar la posibilidad de usar el DCI como tratamiento en trastornos metabólicos que impliquen una disfunción endocrina. En el auge de la búsqueda de biomarcadores tempranos de la EA, estos resultados también abren la posibilidad del estudio de GIP y GLP-1 en plasma como posibles factores de riesgo para el desarrollo de la EA.

Estudios previos han evaluado la eficacia del DCI en el tratamiento de la esteatosis hepática derivada de síndrome metabólico, mostrando resultados positivos al disminuir la cantidad de ácidos grasos, así como la inflamación hepática acontecida. Nuestros resultados, en los que observamos que el DCI era capaz de reducir la carga amiloide y la acumulación de ácidos grasos en el hígado, sugieren que el DCI podría ser útil para el tratamiento de patologías hepáticas.

Previamente se ha descrito que el DCI era capaz de inhibir la resorción ósea *in vitro*. Sin embargo, nuestro estudio es el primero en demostrar la eficacia del DCI en evitar la pérdida de masa ósea en un modelo de EA que presenta osteoporosis. Dado que la osteoporosis es más prevalente en mujeres tras la menopausia, es necesario en un futuro estudiar si la capacidad antiosteoporótica del DCI se basa en su capacidad de modular la señalización endocrina. Estos resultados, en general, sugieren que el DCI es un compuesto capaz de frenar o revertir el envejecimiento prematuro del organismo a través de diversas dianas farmacológicas.

Se ha mostrado previamente que el DCI es capaz de prevenir el daño neuronal inducido por los oligómeros de A β y en nuestro estudio hemos observado que el DCI es capaz de frenar el declive metabólico, así como el declive cognitivo en los ratones 5xFAD. Esta relación entre el declive metabólico y cognitivo es clave para realizar una evaluación temprana del pronóstico de los pacientes de la EA, por lo que es posible que en la clínica sean tenidos en cuenta cada vez más el historial de parámetros endocrinos del paciente junto con los datos de pruebas cognitivas e

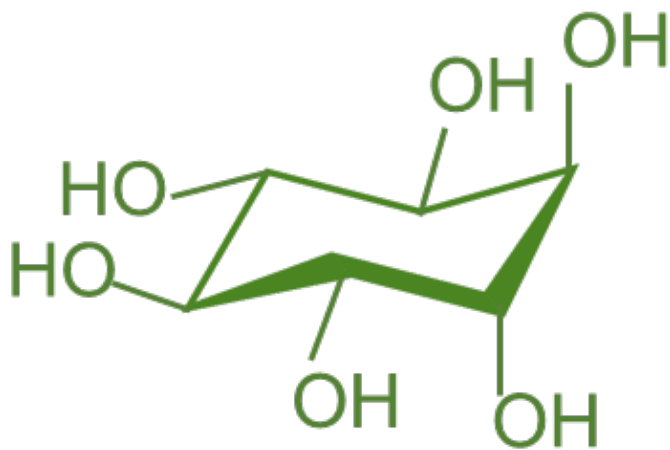
índice de fragilidad para realizar un diagnóstico eficaz de la EA, lo cual supondría una colaboración interdisciplinar entre la endocrinología y la neurología.

Además del papel de DCI en la toxicidad de A β , durante el desarrollo de la tesis doctoral hemos comprobado que el DCI es capaz de reducir la fosforilación de tau, gracias a lo cual hemos generado una patente para el uso del DCI en taupatías. A pesar de la limitación de los modelos animales disponibles hoy en día, se hace necesario evaluar más exhaustivamente la eficacia de una administración crónica de DCI en edades tempranas sobre el desarrollo de la hiperfosforilación de tau, lo cual podría indicar que el DCI es capaz de reducir el declive metabólico y cognitivo a través de rutas complementarias entre sí.

Hemos comenzado a analizar la farmacocinética con el D-Chiro-inositol en humanos, donde se ha determinado el efecto de una dosis aguda en los niveles plasmáticos de hormonas metabólicas e hipofisarias. Tenemos la intención de completar el análisis farmacocinético y toxicológico preclínico de ambos inositoles, para generar un conjunto completo de datos de eficacia y seguridad, tanto en administración aguda como en dosis prolongadas en el tiempo que puedan hacer avanzar estos compuestos hacia los ensayos clínicos. Uno de los mayores hándicaps para el desarrollo de tratamientos efectivos para la EA es la fase de la enfermedad en la que se administra el fármaco, por lo que es esencial combinar el uso de tratamientos como el DCI con marcadores tempranos de la enfermedad. El hecho de que el DCI tiene como dianas terapéuticas aquellos cambios metabólicos en el organismo que son indicativos de un mayor riesgo para el desarrollo de EA, indica que la administración del DCI puede ser un prometedor tratamiento preventivo.

En general, este trabajo supone un primer paso para el desarrollo de productos naturales en colaboración entre empresa y entidades públicas de investigación. La posibilidad de alcanzar resultados traslacionales proporcionaría a la empresa y al grupo de investigación una sinergia que podría aplicarse al desarrollo de otros principios activos naturales.

7. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS



1. El D-Chiro-inositol (DCI) es un compuesto natural esencial para la señalización de insulina, cuya administración muestra un efecto positivo en la liberación y sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina, además de mostrar capacidad antiinflamatoria, reducir el estrés oxidativo celular y proteger al hígado de patologías asociadas a la esteatosis. El DCI y sus análogos son capaces de interaccionar con la producción de la proteína A β mediada por la γ -secretasa, disminuyen la unión de formas oligoméricas solubles de A β a la superficie celular y promueven la desfosforilación de la proteína tau. El DCI es un potencial candidato para tratar los trastornos metabólicos que presentan los pacientes de Alzheimer en estadios tempranos de la enfermedad y que se encuentran ligados a la patología amiloide. La identificación de los mecanismos moleculares que ocurren en los estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer permite evaluar la eficacia de un tratamiento con el DCI.
2. El modelo 5xFAD de la enfermedad de Alzheimer presenta un balance energético negativo asociado al desarrollo de la patología amiloide a los 6 meses de edad. Estos cambios se encuentran asociados a un estado inflamatorio del hipotálamo, a pesar de la ausencia de placas A β . La pérdida de peso corporal en los ratones 5xFAD es más acusada en las hembras y acrecentada en el modelo homocigoto para las mutaciones de APP y PS1 respecto al modelo heterocigoto. La alteración en el patrón de ingesta y la pérdida de peso se produce de forma progresiva, siendo más evidente a los 10 meses de edad en el modelo 5xFAD. Este hecho es similar al riesgo asociado al desarrollo de Alzheimer en pacientes con menor peso corporal en la mediana edad y que muestran una pérdida de peso a lo largo de los años, asociado a un envejecimiento prematuro.
3. La disfunción hipotalámica provoca alteraciones en la ingesta del modelo 5xFAD. El estado inflamatorio y la activación de astrocitos determinada por GFAP deriva en una menor expresión de genes de neuropéptidos encargados de regular el apetito y el gasto energético, derivando en una menor ingesta y peso corporal, el cual es acompañado por un descenso del gasto energético. El modelo 5xFAD también presenta una alteración en los niveles de lípidos en sangre y menores niveles plasmáticos de insulina y sus secretagogos, además de una disminución en la señalización de insulina y leptina en el hipotálamo, lo cual influye en el patrón de regulación metabólica. La disminución de los niveles de insulina se corresponde con un factor de riesgo de Alzheimer asociado a un menor peso corporal y niveles de triglicéridos y colesterol en sangre.
4. A una edad más avanzada, las hembras 5xFAD muestran alteraciones metabólicas específicas de sexo. Se observa fenotipo de acumulación ectópica de grasa en el hígado, asociado a una respuesta inflamatoria, la disminución de los niveles en plasma de insulina y un aumento de los niveles de FSH, los cuales se encuentran relacionados con el inicio de la menopausia. La acumulación de proteínas amiloides en el hígado se encuentra directamente relacionada con los niveles de ácidos grasos en el hígado de las hembras 5xFAD. Las hembras 5xFAD también muestran un fenotipo osteoporótico, con alteraciones en el volumen y número de trabéculas del fémur, así como una pérdida del área y grosor cortical del fémur, indicativo de un envejecimiento prematuro. Estos

resultados concuerdan con el riesgo incrementado de osteoporosis y esteatosis en pacientes con enfermedad de Alzheimer, específicamente en las mujeres.

5. El tratamiento con DCI a través de su administración vía oral durante 4 meses previene la pérdida de peso progresiva mostrada por el modelo 5xFAD. El DCI es capaz de normalizar la ingesta de los animales 5xFAD en relación con su peso corporal a través de la disminución de la respuesta astrocitaria en el hipotálamo y el incremento de la expresión de los neuropéptidos involucrados en el apetito, NPY y AgRP. El tratamiento con DCI normalizó los niveles plasmáticos de triglicéridos, insulina y sus secretagogos, además de disminuir los niveles elevados de FSH en las hembras del modelo 5xFAD. Estos resultados sugieren que el DCI es capaz de prevenir el declive metabólico asociado a un envejecimiento prematuro.

6. Las hembras del modelo 5xFAD tratadas con DCI muestran menores niveles de ácidos grasos en el hígado, a través de un aumento de la señalización de insulina en el hígado, un descenso de los niveles plasmáticos de FSH y de la respuesta inflamatoria, así como a la disminución de placas amiloides observadas mediante histología en el tejido hepático. El DCI también revirtió la pérdida de masa ósea en las hembras del modelo 5xFAD, la cual se encontraba asociada a un descenso de la señalización de insulina. Otros estudios son necesarios para evaluar la presencia de proteína A β en el hueso. Los resultados sugieren que la suplementación oral de DCI en estadios tempranos del Alzheimer podría frenar el avance del fenotipo de deterioro metabólico específico de mujeres.

1. D-Chiro-inositol (DCI) is a natural compound essential for insulin signaling, whose administration shows a positive effect on the release and sensitivity of peripheral tissues to insulin, in addition to depicting anti-inflammatory capacity, reducing cellular oxidative stress and protecting the liver from pathologies associated with steatosis. DCI and its analogues can modulate γ -secretase-mediated A β production, decrease the binding of soluble oligomeric forms of A β to the cell surface and promote tau protein dephosphorylation. DCI is a potential candidate for the treatment of metabolic disorders exhibited by Alzheimer's patients in early stages of the disease linked to the amyloid pathology. The identification of the molecular mechanisms occurring in the early stages of Alzheimer's disease will allow to evaluate the efficacy of the DCI treatment.
2. The 5xFAD transgenic model of Alzheimer's disease shows a negative energy balance related to the development of amyloid pathology at 6 months of age. These changes are associated with an inflammatory state of the hypothalamus, despite the absence of A β plaques. Body weight loss in 5xFAD mice is more pronounced in females and increased in the homozygous model for APP and PS1 mutations with respect to the heterozygous model. Alterations in the food intake pattern and weight loss are shown to occur progressively, being more evident at 10 months of age in the 5xFAD model. These results are in agreement with the risk associated with the development of Alzheimer's disease in patients with lower body weight in middle age and those who show weight loss over the years, being a mark of premature aging.
3. Hypothalamic dysfunction causes disturbances in the food intake pattern of the 5xFAD model. Presence of inflammatory cytokines astrocytic reactivity determined by GFAP leads to a lower expression of neuropeptides responsible for regulating appetite and energy expenditure, resulting in a lower intake and body weight, which is accompanied by a decrease in energy expenditure. The 5xFAD model also presents altered blood lipid levels and lower plasma insulin, GIP and GLP-1, in addition to a decrease in insulin and leptin signaling in the hypothalamus, which influences the hypothalamic control of whole-body metabolism. Decreased insulin levels correspond to a risk factor for Alzheimer's disease associated with lower body weight and blood triacylglyceride and cholesterol levels.
4. At 10 months of age, 5xFAD females show sex-specific metabolic disturbances. A phenotype of ectopic fat accumulation in the liver is observed, associated with an inflammatory response, decreased plasma insulin and increased plasma FSH, which are associated with the onset of menopause. The accumulation of amyloid proteins in the liver is directly related to fatty acid deposition in the liver of 5xFAD females. The females of the 5xFAD model also show an osteoporotic phenotype, with alterations in the volume and number of femoral trabeculae, as well as a loss of femoral cortical area and thickness, indicative of premature aging. These findings are consistent with the increased risk of osteoporosis and steatosis in patients with Alzheimer's disease, specifically in women.

5. Oral administration of DCI for 4 months prevents the progressive weight loss shown by the 5xFAD model. DCI is able to normalize the food intake pattern of 5xFAD mice in relation to their body weight by decreasing the astrocyte response in the hypothalamus and increasing the expression of the neuropeptides involved in appetite, NPY and AgRP. DCI treatment normalized plasma levels of triglycerides, insulin and its secretagogues, in addition to decreasing elevated FSH levels in females of the 5xFAD model. These results suggest that DCI is able to prevent metabolic decline associated with premature aging.

6. The females of the 5xFAD model treated with DCI depict lower fatty acids deposition in the liver, in a mechanism involving increased insulin signaling in the liver, decreased plasma FSH levels and inflammatory response, as well as decreased amyloid plaques count as seen by histology in liver tissue. DCI also reversed bone loss in females of the 5xFAD model, which was associated with a decrease in insulin signaling. Further studies are needed to evaluate the presence of A β protein in bone. The results suggest that oral DCI supplementation in early stages of Alzheimer's disease may slow down the progression of the female-specific metabolic impairments.

8. BIBLIOGRAFÍA



1. Pitt J, Thorner M, Brautigam 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.
2. Yuan S, Wu W, Ma W, Huang X, Huang T, Peng M, et al. Body mass index, genetic susceptibility, and Alzheimer's disease: a longitudinal study based on 475,813 participants from the UK Biobank. *J Transl Med*. 2022;20(1):417.
3. Anstey K, Cherbuin N, Budge M, Young J. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obesity reviews*. 2011;12(5):e426-e37.
4. Qizilbash N, Gregson J, Johnson ME, Pearce N, Douglas I, Wing K, et al. BMI and risk of dementia in two million people over two decades: a retrospective cohort study. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2015;3(6):431-6.
5. Fitzpatrick AL, Kuller LH, Lopez OL, Diehr P, O'Meara ES, Longstreth W, et al. Midlife and late-life obesity and the risk of dementia: cardiovascular health study. *Archives of neurology*. 2009;66(3):336-42.
6. Jimenez A, Pegueroles J, Carmona-Iragui M, Vilaplana E, Montal V, Alcolea D, et al. Weight loss in the healthy elderly might be a non-cognitive sign of preclinical Alzheimer's disease. *Oncotarget*. 2017;8(62):104706.
7. Barrett-Connor E, Edelstein S, Corey-Bloom J, Wiederholt W. Weight loss precedes dementia in community-dwelling older adults. *Age & nutrition (Paris)*. 1998;9(3).
8. Gao S, Nguyen JT, Hendrie HC, Unverzagt FW, Hake A, Smith-Gamble V, et al. Accelerated weight loss and incident dementia in an elderly African-American cohort. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2011;59(1):18-25.
9. Tamura BK, Masaki KH, Blanchette PL. Weight loss in patients with Alzheimer's disease. *Journal of nutrition for the elderly*. 2008;26(3-4):21-38.
10. Peila R, Rodriguez BL, White LR, Launer LJ. Fasting insulin and incident dementia in an elderly population of Japanese-American men. *Neurology*. 2004;63(2):228-33.
11. Mehlig K, Lapidus L, Thelle DS, Waern M, Zetterberg H, Björkelund C, et al. Low fasting serum insulin and dementia in nondiabetic women followed for 34 years. *Neurology*. 2018;91(5):e427-e35.
12. Monastra G, Vazquez-Levin M, Bezerra Espinola MS, Bilotta G, Laganà AS, Unfer V. D-chiro-inositol, an aromatase down-modulator, increases androgens and reduces estrogens in male volunteers: a pilot study. *Basic and Clinical Andrology*. 2021;31(1):1-17.
13. Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, et al. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A β deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Experimental neurology*. 2003;184(1):247-63.
14. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience*. 2006;26(40):10129-40.
15. Casas C, Sergeant N, Itier J-M, Blanchard V, Wirths O, Van Der Kolk N, et al. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated A β 42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *The American journal of pathology*. 2004;165(4):1289-300.
16. 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2022;18(4):700-89.
17. American Psychiatric Association. *Neurocognitive Disorders. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed. Washington, DC2013. p. 611-4.
18. Sabuncu MR, Desikan RS, Sepulcre J, Yeo BT, Liu H, Schmansky NJ, et al. The dynamics of cortical and hippocampal atrophy in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2011;68(8):1040-8.
19. O'brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual review of neuroscience*. 2011;34:185-204.

20. Wen J, Fang F, Guo S-H, Zhang Y, Peng X-L, Sun W-M, et al. Amyloid β -derived diffusible ligands (ADDLs) induce abnormal autophagy associated with A β aggregation degree. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2018;64(2):162-74.
21. Sharoar MG, Palko S, Ge Y, Saido TC, Yan R. Accumulation of saposin in dystrophic neurites is linked to impaired lysosomal functions in Alzheimer's disease brains. *Molecular Neurodegeneration*. 2021;16(1):1-17.
22. Fiala JC, Feinberg M, Peters A, Barbas H. Mitochondrial degeneration in dystrophic neurites of senile plaques may lead to extracellular deposition of fine filaments. *Brain Structure and Function*. 2007;212(2):195-207.
23. Su JH, Cummings BJ, Cotman CW. Plaque biogenesis in brain aging and Alzheimer's disease. II. Progressive transformation and developmental sequence of dystrophic neurites. *Acta neuropathologica*. 1998;96(5):463-71.
24. Ries M, Sastre M. Mechanisms of A β clearance and degradation by glial cells. *Frontiers in aging neuroscience*. 2016;8:160.
25. Xie Z, Meng J, Kong W, Wu Z, Lan F, Hayashi Y, et al. Microglial cathepsin E plays a role in neuroinflammation and amyloid β production in Alzheimer's disease. *Aging Cell*. 2022;21(3):e13565.
26. Eckman EA, Reed DK, Eckman CB. Degradation of the Alzheimer's amyloid β peptide by endothelin-converting enzyme. *Journal of Biological chemistry*. 2001;276(27):24540-8.
27. Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H. Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid β -peptide (A β); retards A β aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(51):47863-8.
28. Yan P, Hu X, Song H, Yin K, Bateman RJ, Cirrito JR, et al. Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid- β fibrils in vitro and compact plaques in situ. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(34):24566-74.
29. Toppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(2):289-305.
30. Harris FM, Tesseur I, Brecht WJ, Xu Q, Mullendorff K, Chang S, et al. Astroglial regulation of apolipoprotein E expression in neuronal cells: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(5):3862-8.
31. Liu C-C, Hu J, Zhao N, Wang J, Wang N, Cirrito JR, et al. Astrocytic LRP1 mediates brain A β clearance and impacts amyloid deposition. *Journal of Neuroscience*. 2017;37(15):4023-31.
32. Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, et al. apoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(12):4002-13.
33. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, et al. Clearance of Alzheimer's amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(12):1489-99.
34. Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015;52:1-18.
35. Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, et al. Adult mouse astrocytes degrade amyloid- β in vitro and in situ. *Nature medicine*. 2003;9(4):453-7.
36. Terwel D, Steffensen KR, Verghese PB, Kummer MP, Gustafsson J-Å, Holtzman DM, et al. Critical role of astroglial apolipoprotein E and liver X receptor- α expression for microglial A β phagocytosis. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(19):7049-59.
37. Busquets O, Ettcheto M, Pallas M, Beas-Zarate C, Verdaguer E, Auladell C, et al. Long-term exposition to a high fat diet favors the appearance of beta-amyloid depositions in the brain of C57BL/6J mice. A potential model of sporadic Alzheimer's disease. *Mechanisms of ageing and development*. 2017;162:38-45.
38. Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, et al. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *Journal of neuroimmunology*. 2010;219(1-2):25-32.

39. Kim MS, Choi M-S, Han SN. High fat diet-induced obesity leads to proinflammatory response associated with higher expression of NOD2 protein. *Nutr Res Pract.* 2011;5(3):219-23.
40. HO L, QIN W, POMPL PN, XIANG Z, WANG J, ZHAO Z, et al. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal.* 2004;18(7):902-4.
41. Soto M, Cai W, Konishi M, Kahn CR. Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2019;116(13):6379-84.
42. Kleinridders A, Cai W, Cappellucci L, Ghazarian A, Collins WR, Vienberg SG, et al. Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2015;112(11):3463-8.
43. Zhao F, Siu JJ, Huang W, Askwith C, Cao L. Insulin modulates excitatory synaptic transmission and synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Neuroscience.* 2019;411:237-54.
44. Reagan L, Cowan H, Woodruff J, Piroli G, Erichsen J, Evans A, et al. Hippocampal-specific insulin resistance elicits behavioral despair and hippocampal dendritic atrophy. *Neurobiology of stress.* 2021;15:100354.
45. Cai W, Xue C, Sakaguchi M, Konishi M, Shirazian A, Ferris HA, et al. Insulin regulates astrocyte gliotransmission and modulates behavior. *The Journal of clinical investigation.* 2018;128(7):2914-26.
46. Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis.* 2005;8(3):247-68.
47. Talbot K, Wang H-Y, Kazi H, Han L-Y, Bakshi KP, Stucky A, et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *The Journal of clinical investigation.* 2012;122(4):1316-38.
48. Zhao N, Liu C-C, Van Ingelgom AJ, Martens YA, Linares C, Knight JA, et al. Apolipoprotein E4 impairs neuronal insulin signaling by trapping insulin receptor in the endosomes. *Neuron.* 2017;96(1):115-29. e5.
49. Reiman EM, Chen K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandy D, Osborne D, et al. Correlations between apolipoprotein E ϵ 4 gene dose and brain-imaging measurements of regional hypometabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005;102(23):8299-302.
50. Triani F, Tramutola A, Di Domenico F, Sharma N, Butterfield DA, Head E, et al. Biliverdin reductase-A impairment links brain insulin resistance with increased A β production in an animal model of aging: Implications for Alzheimer disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(10):3181-94.
51. Gonçalves RA, Wijesekara N, Fraser PE, De Felice FG. The link between tau and insulin signaling: implications for Alzheimer's disease and other tauopathies. *Frontiers in cellular neuroscience.* 2019;13:17.
52. Marciniak E, Leboucher A, Caron E, Ahmed T, Tailleux A, Dumont J, et al. Tau deletion promotes brain insulin resistance. *Journal of Experimental Medicine.* 2017;214(8):2257-69.
53. Aging Nlo. NIA-Funded Active Alzheimer's and Related Dementias Clinical Trials and Studies. 2022.
54. Buchman AS, Wilson RS, Bienias JL, Shah RC, Evans DA, Bennett DA. Change in body mass index and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology.* 2005;65(6):892-7.
55. Johnson DK, Wilkins CH, Morris JC. Accelerated weight loss may precede diagnosis in Alzheimer disease. *Archives of neurology.* 2006;63(9):1312-7.
56. Franx BA, Arnoldussen IA, Kiliaan AJ, Gustafson DR. Weight loss in patients with dementia: considering the potential impact of pharmacotherapy. *Drugs & aging.* 2017;34(6):425-36.

57. Möllers T, Stocker H, Perna L, Nabers A, Rujescu D, Hartmann AM, et al. A β misfolding in blood plasma is inversely associated with body mass index even in middle adulthood. *Alzheimer's research & therapy*. 2021;13(1):1-9.
58. Gillette-Guyonnet S, Van Kan GA, Alix E, Andrieu S. IANA (International Academy on Nutrition and Aging) Expert Group: weight loss and Alzheimer's disease. *The journal of nutrition, health & aging*. 2007;11(1):38.
59. Müller S, Preische O, Sohrabi HR, Gräber S, Jucker M, Dietzsch J, et al. Decreased body mass index in the preclinical stage of autosomal dominant Alzheimer's disease. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-7.
60. Callen D, Black SE, Gao F, Caldwell C, Szalai J. Beyond the hippocampus: MRI volumetry confirms widespread limbic atrophy in AD. *Neurology*. 2001;57(9):1669-74.
61. Baloyannis SJ, Mavroudis I, Mitilineos D, Baloyannis IS, Costa VG. The hypothalamus in Alzheimer's disease: a Golgi and electron microscope study. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*®. 2015;30(5):478-87.
62. Baloyannis SJ, Mavroudis I, Mitilineos D, Baloyannis IS, Costa VG. The Hypothalamus in Alzheimer's Disease. *Hypothalamus in Health and Diseases: IntechOpen*; 2018.
63. Do K, Laing BT, Landry T, Bunner W, Mersaud N, Matsubara T, et al. The effects of exercise on hypothalamic neurodegeneration of Alzheimer's disease mouse model. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190205.
64. Griffith CM, Macklin LN, Cai Y, Sharp AA, Yan X-X, Reagan LP, et al. Impaired glucose tolerance and reduced plasma insulin precede decreased AKT phosphorylation and GLUT3 translocation in the hippocampus of old 3xTg-AD mice. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019;68(2):809-37.
65. Vandal M, White PJ, Chevrier G, Tremblay C, St.-Amour I, Planel E, et al. Age-dependent impairment of glucose tolerance in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*. 2015;29(10):4273-84.
66. Baranowska-Bik A, Bik W, Styczynska M, Chodakowska-Zebrowska M, Barcikowska M, Wolinska-Witort E, et al. Plasma leptin levels and free leptin index in women with Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015;52:73-8.
67. Weller I, Schatzker J. Hip fractures and Alzheimer's disease in elderly institutionalized Canadians. *Annals of epidemiology*. 2004;14(5):319-24.
68. Liu D, Zhou H, Tao Y, Tan J, Chen L, Huang H, et al. Alzheimer's disease is associated with increased risk of osteoporosis: the Chongqing Aging Study. *Current Alzheimer research*. 2016;13(10):1165-72.
69. Frame G, Bretland KA, Dengler-Crish CM. Mechanistic complexities of bone loss in Alzheimer's disease: a review. *Connective tissue research*. 2020;61(1):4-18.
70. Loskutova N, Honea RA, Brooks WM, Burns JM. Reduced limbic and hypothalamic volumes correlate with bone density in early Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010;20(1):313-22.
71. Paganini-Hill A, Henderson VW. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol*. 1994;140(3):256-61.
72. Xiong J, Kang SS, Wang Z, Liu X, Kuo T-C, Korkmaz F, et al. FSH blockade improves cognition in mice with Alzheimer's disease. *Nature*. 2022;603(7901):470-6.
73. Xiang Y, Bu XL, Liu YH, Zhu C, Shen LL, Jiao SS, et al. Physiological amyloid-beta clearance in the periphery and its therapeutic potential for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2015;130(4):487-99.
74. Maarouf CL, Walker JE, Sue LI, Dugger BN, Beach TG, Serrano GE. Impaired hepatic amyloid-beta degradation in Alzheimer's disease. *PloS one*. 2018;13(9):e0203659.
75. Sehgal N, Gupta A, Valli RK, Joshi SD, Mills JT, Hamel E, et al. *Withania somnifera* reverses Alzheimer's disease pathology by enhancing low-density lipoprotein receptor-related protein in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(9):3510-5.

76. Kim D-G, Krenz A, Toussaint LE, Maurer KJ, Robinson S-A, Yan A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease induces signs of Alzheimer's disease (AD) in wild-type mice and accelerates pathological signs of AD in an AD model. *Journal of neuroinflammation*. 2016;13(1):1-18.
77. Lam V, Takechi R, Hackett MJ, Francis R, Bynevelt M, Celliers LM, et al. Synthesis of human amyloid restricted to liver results in an Alzheimer disease-like neurodegenerative phenotype. *PLoS biology*. 2021;19(9):e3001358.
78. Wiest R, Weiss TS, Danielyan L, Buechler C. Serum amyloid beta42 is not eliminated by the cirrhotic liver: a pilot study. *Journal of clinical medicine*. 2021;10(12):2669.
79. Jin W-S, Shen L-L, Bu X-L, Zhang W-W, Chen S-H, Huang Z-L, et al. Peritoneal dialysis reduces amyloid-beta plasma levels in humans and attenuates Alzheimer-associated phenotypes in an APP/PS1 mouse model. *Acta neuropathologica*. 2017;134(2):207-20.
80. Larner J, Brautigan DL, Thorner MO. D-chiro-inositol glycans in insulin signaling and insulin resistance. *Molecular Medicine*. 2010;16(11):543-52.
81. Lazarenko R, Geisler J, Bayliss D, Larner J, Li C. D-chiro-inositol glycan stimulates insulin secretion in pancreatic β cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;387(1-2):1-7.
82. SILVA JÚNIOR JA, Silva ACD, Figueiredo LS, Araujo TR, Freitas IN, Carneiro EM, et al. d-Pinitol increases insulin secretion and regulates hepatic lipid metabolism in Mdg-obese mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2020;92.
83. 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.
84. Li Xi, Xu M, Yu F, Fu Cl, Yu X, Cheng M, et al. Effects of D-pinitol on myocardial apoptosis and fibrosis in streptozocin-induced aging-accelerated mice. *Journal of Food Biochemistry*. 2021;45(4):e13669.
85. Fan C, Liang W, Wei M, Gou X, Han S, Bai J. Effects of D-Chiro-Inositol on Glucose Metabolism in db/db Mice and the Associated Underlying Mechanisms. *Frontiers in pharmacology*. 2020;11:354.
86. Montt-Guevara MM, Finiguerra M, Marzi I, Fideicicchi T, Ferrari A, Genazzani AD, et al. D-Chiro-Inositol Regulates Insulin Signaling in Human Adipocytes. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12:660815.
87. Pasinetti GM. Compositions and methods for treating Alzheimer's disease and related disorders and promoting a healthy nervous system. *Google Patents*; 2014.
88. 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? *British Journal of Pharmacology*. 2022.
89. Saltiel AR, Cuatrecasas P. Insulin stimulates the generation from hepatic plasma membranes of modulators derived from an inositol glycolipid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986;83(16):5793-7.
90. Best MD, Zhang H, Prestwich GD. Inositol polyphosphates, diphosphoinositol polyphosphates and phosphatidylinositol polyphosphate lipids: structure, synthesis, and development of probes for studying biological activity. *Natural Product Reports*. 2010;27(10):1403-30.
91. Pak Y, Paule CR, Bao Y-D, Huang LC, Larner J. Insulin stimulates the biosynthesis of chiro-inositol-containing phospholipids in a rat fibroblast line expressing the human insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(16):7759-63.
92. Sun T-h, 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;293(3):1092-8.
93. 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 Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014;4(5):384-90.

94. Vasaiakar N, Mahajan U, Patil KR, Suchal K, Patil CR, Ojha S, et al. D-pinitol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: Impact on pro-inflammatory cytokines. *Chemico-biological interactions*. 2018;290:6-11.
95. Roman-Ramos R, Almanza-Perez J, Fortis-Barrera A, Angeles-Mejia S, Banderas-Dorantes T, Zamilpa-Alvarez A, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of a hypoglycemic fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouché in streptozotocin-induced diabetes mice. *The American journal of Chinese medicine*. 2012;40(01):97-110.
96. Choi M-S, Lee W-H, Kwon E-Y, Kang MA, Lee M-K, Park YB, et al. Effects of soy pinitol on the pro-inflammatory cytokines and scavenger receptors in oxidized low-density lipoprotein-treated THP-1 macrophages. *Journal of medicinal food*. 2007;10(4):594-601.
97. Jayasooriya RGPT, Kang C-H, Park SR, Choi Y-H, Kim G-Y. Pinitol suppresses tumor necrosis factor- α -induced invasion of prostate cancer LNCaP cells by inhibiting nuclear factor- κ B-Mediated matrix Metalloproteinase-9 expression. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2015;14(8):1357-64.
98. 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. *Chemico-biological interactions*. 2010;188(1):237-45.
99. Bates SH, Jones RB, Bailey CJ. Insulin-like effect of pinitol. *British journal of pharmacology*. 2000;130(8):1944-8.
100. Choi MS, Lee MK, Jung UJ, Kim HJ, Do GM, Park YB, et al. Metabolic response of soy pinitol on lipid-lowering, antioxidant and hepatoprotective action in hamsters fed-high fat and high cholesterol diet. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(6):751-9.
101. Lee JS, Lee C-M, Jeong Y-I, Jung ID, Kim B-H, Seong E-Y, et al. D-pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. *Febs Letters*. 2007;581(1):57-64.
102. Liu S-C, Chuang S-M, Tang C-H. D-pinitol inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *International immunopharmacology*. 2012;12(3):494-500.
103. Yu J, Choi S, Park E-S, Shin B, Yu J, Lee SH, et al. D-chiro-inositol negatively regulates the formation of multinucleated osteoclasts by down-regulating NFATc1. *Journal of clinical immunology*. 2012;32(6):1360-71.
104. Grossman H, Marzloff G, Luo X, LeRoith D, Sano M, Pasinetti G. NIC5-15 as a treatment for Alzheimer's: safety, pharmacokinetics and clinical variables. *Alzheimer's & Dementia*. 2009;5(4):P259.
105. Hada B, Yoo M-R, Seong KM, Jin Y-W, Myeong H-K, Min K-J. D-chiro-inositol and pinitol extend the life span of *Drosophila melanogaster*. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2013;68(3):226-34.
106. Du X, Wang Y, Wang J, Liu X, Chen J, Kang J, et al. d-Chiro-Inositol extends the lifespan of male *Drosophila melanogaster* better than d-Pinitol through insulin signaling and autophagy pathways. *Experimental Gerontology*. 2022;165:111856.
107. Farias V, Macêdo F, Oquendo M, Tomé A, Bão S, Cintra D, et al. Chronic treatment with d-chiro-inositol prevents autonomic and somatic neuropathy in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2011;13(3):243-50.
108. Kong J, Du Z, Dong L. Pinitol prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia mediated by TREM2. *Neurotoxicity research*. 2020;38(1):96-104.
109. Lalioti V, Muruais G, Dinarina A, van Damme J, Vandekerckhove J, Sandoval IV. The atypical kinase Cdk5 is activated by insulin, regulates the association between GLUT4 and E-Syt1, and modulates glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(11):4249-53.
110. Rodríguez de Fonseca F, Navarro Galera JA, Baixeras Llanos E, Manuel DDOJ, Medina Vera D, López Gambero AJ, et al. Composition for preventing and treating tauopathies. *Google Patents*; 2022.

111. Do K, Laing BT, Landry T, Bunner W, Mersaud N, Matsubara T, et al. The effects of exercise on hypothalamic neurodegeneration of Alzheimer's disease mouse model. *PLoS one*. 2018;13(1):e0190205-e.
112. Robison LS, Gannon OJ, Thomas MA, Salinero AE, Abi-Ghanem C, Poitelon Y, et al. Role of sex and high-fat diet in metabolic and hypothalamic disturbances in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*. 2020;17(1):285-.
113. Arruda AP, Milanski M, Coope A, Torsoni AS, Ropelle E, Carvalho DP, et al. Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. *Endocrinology*. 2011;152(4):1314-26.
114. Cortés N, Andrade V, Guzmán-Martínez L, Estrella M, Maccioni RB. Neuroimmune tau mechanisms: their role in the progression of neuronal degeneration. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(4):956.
115. Peila R, Rodriguez BL, White LR, Launer LJ. Fasting insulin and incident dementia in an elderly population of Japanese-American men. *Neurology*. 2004;63(2):228-33.
116. Griffith CM, Macklin LN, Cai Y, Sharp AA, Yan XX, Reagan LP, et al. Impaired Glucose Tolerance and Reduced Plasma Insulin Precede Decreased AKT Phosphorylation and GLUT3 Translocation in the Hippocampus of Old 3xTg-AD Mice. *J Alzheimers Dis*. 2019;68(2):809-37.
117. Vandal M, White PJ, Chevrier G, Tremblay C, St.-Amour I, Planel E, et al. Age-dependent impairment of glucose tolerance in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*. 2015;29(10):4273-84.
118. Ishii M, Hiller AJ, Pham L, McGuire MJ, Iadecola C, Wang G. Amyloid-beta modulates low-threshold activated voltage-gated L-type calcium channels of arcuate neuropeptide Y neurons leading to calcium dysregulation and hypothalamic dysfunction. *Journal of Neuroscience*. 2019;39(44):8816-25.
119. Ishii M, Wang G, Racchumi G, Dyke JP, Iadecola C. Transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein exhibit early metabolic deficits and a pathologically low leptin state associated with hypothalamic dysfunction in arcuate neuropeptide Y neurons. *Journal of Neuroscience*. 2014;34(27):9096-106.
120. Beal M, Mazurek M, Chatta G, Bird E, Martin J, editors. Neuropeptide Y immunoreactivity is reduced in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Soc Neurosci Abstr*; 1985.
121. Unger J, McNeill T, Lapham L, Hamill R. Neuropeptides and neuropathology in the amygdala in Alzheimer's disease: relationship between somatostatin, neuropeptide Y and subregional distribution of neuritic plaques. *Brain research*. 1988;452(1-2):293-302.
122. Scholefield D, Zedan H, Jifeng H. A specification-oriented semantics for the refinement of real-time systems. *Theoretical Computer Science*. 1994;131(1):219-41.
123. Rose JB, Crews L, Rockenstein E, Adame A, Mante M, Hersh LB, et al. Neuropeptide Y fragments derived from neprilysin processing are neuroprotective in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 2009;29(4):1115-25.
124. Grau-Rivera O, Navalpotro-Gomez I, Sánchez-Benavides G, Suárez-Calvet M, Milà-Alomà M, Arenaza-Urquijo EM, et al. Association of weight change with cerebrospinal fluid biomarkers and amyloid positron emission tomography in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2021;13(1):1-12.
125. Sleevi M, Allan G. Compositions comprising D-chiro inositol and sulfonylureas and methods of treatment thereof. *Google Patents*; 2002.
126. Bertone-Johnson ER, Virtanen JK, Niskanen L, Nurmi T, Ronkainen K, Voutilainen S, et al. Association of follicle-stimulating hormone levels and risk of type 2 diabetes in older postmenopausal women. *Menopause*. 2017;24(7):796-802.
127. Navarro JA, Díaz C, Decara J, Medina-Vera D, Lopez-Gambero AJ, Suarez J, et al. Pharmacokinetics and Endocrine Effects of an Oral Dose of D-Pinitol in Human Fasting Healthy Volunteers. *Nutrients*. 2022;14(19):4094.
128. Xia B, Cai GH, Yang H, Wang SP, Mitchell GA, Wu JW. Adipose tissue deficiency of hormone-sensitive lipase causes fatty liver in mice. *PLoS Genet*. 2017;13(12):e1007110.

129. Zhu Y, Xu J, Zhang X, Ke Y, Fu G, Guo Q. A low follicle-stimulating hormone level is a protective factor for non-alcoholic fatty liver disease in older men aged over 80. *BMC Geriatrics*. 2021;21(1):544.
130. Cui H, Zhao G, Liu R, Zheng M, Chen J, Wen J. FSH stimulates lipid biosynthesis in chicken adipose tissue by upregulating the expression of its receptor FSHR. *J Lipid Res*. 2012;53(5):909-17.
131. Softic S, Kirby M, Berger NG, Shroyer NF, Woods SC, Kohli R. Insulin concentration modulates hepatic lipid accumulation in mice in part via transcriptional regulation of fatty acid transport proteins. *PLoS One*. 2012;7(6):e38952.
132. Cheng F, Yun S-j, Cao J-l, Chang M-c, Meng J-l, Liu J-y, et al. Differential Gene Expression and Biological Analyses of Primary Hepatocytes Following D-Chiro-Inositol Supplement. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12.
133. Zhao S-s, Li N-r, Zhao W-l, Liu H, Ge M-x, Zhang Y-x, et al. D-chiro-inositol effectively attenuates cholestasis in bile duct ligated rats by improving bile acid secretion and attenuating oxidative stress. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018;39(2):213-21.
134. Roman-Ramos R, Almanza-Perez JC, Fortis-Barrera A, Angeles-Mejia S, Banderas-Dorantes TR, Zamilpa-Alvarez A, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of a hypoglycemic fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouché in streptozotocin-induced diabetes mice. *Am J Chin Med*. 2012;40(1):97-110.
135. Cheng F, Han L, Xiao Y, Pan C, Li Y, Ge X, et al. d-chiro-Inositol ameliorates high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance via PKC ϵ -PI3K/AKT pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2019;67(21):5957-67.
136. Chen Y-H, Lo RY. Alzheimer's disease and osteoporosis. *Tzu-Chi Medical Journal*. 2017;29(3):138.
137. Zhou R, Deng J, Zhang M, Zhou H-D, Wang Y-J. Association between bone mineral density and the risk of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2011;24(1):101-8.
138. Chen H, Zhou X, Fujita H, Onozuka M, Kubo K-Y. Age-related changes in trabecular and cortical bone microstructure. *International journal of endocrinology*. 2013;2013.
139. Stapledon CJ, Stamenkov R, Cappai R, Clark JM, Bourke A, Bogdan Solomon L, et al. Relationships between the bone expression of Alzheimer's disease-related genes, bone remodelling genes and cortical bone structure in neck of femur fracture. *Calcified Tissue International*. 2021;108(5):610-21.
140. Xia WF, Jung JU, Shun C, Xiong S, Xiong L, Shi XM, et al. Swedish mutant APP suppresses osteoblast differentiation and causes osteoporotic deficit, which are ameliorated by N-acetyl-L-cysteine. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2013;28(10):2122-35.
141. Li S, Yang B, Teguh D, Zhou L, Xu J, Rong L. Amyloid β peptide enhances RANKL-induced osteoclast activation through NF- κ B, ERK, and calcium oscillation signaling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(10):1683.
142. Tangseefa P, Martin SK, Fitter S, Baldock PA, Proud CG, Zannettino AC. Osteocalcin-dependent regulation of glucose metabolism and fertility: Skeletal implications for the development of insulin resistance. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(5):3769-83.
143. Kim JG, Sun B-H, Dietrich MO, Koch M, Yao G-Q, Diano S, et al. AgRP neurons regulate bone mass. *Cell reports*. 2015;13(1):8-14.
144. Gauthier S, Rosa-Neto P, Morais J, Webster C. World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia. *Alzheimer's Disease International*. 2021.
145. Ezpeleta D, Pozo-Rosich P, Romero J, Veiga AG, Lasaosa SS. Guías diagnósticas y terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología. Guía oficial de práctica clínica en cefaleas Editorial Luzan. 2015;5.
146. Sagués Amadó A, Pérez Lucena A, García Cañete Á, Espinosa Almendro JM, Velasco Rivas A, Bascón Morales M, et al. Estrategia de Alzheimer de Andalucía. 2017.
147. Cousido S, Carnero C, Fernández R, Gil E, Gómez M, González V, et al. Proceso Asistencial Integrado. Demencia. Sevilla: Consejería de Salud. Recuperado de: <http://bit.ly/1zzoTaq>; 2002.

148. Lobo A, Escobar V, Ezquerro J, Seva Díaz A. " El Mini-Examen Cognoscitivo"(Un test sencillo, práctico, para detectar alteraciones intelectuales en pacientes psiquiátricos). *Revista de psiquiatría y Psicología Médica*. 1980.
149. Kaufman DM, Geyer HL, Milstein MJ. Chapter 7 - Dementia. In: Kaufman DM, Geyer HL, Milstein MJ, editors. *Kaufman's Clinical Neurology for Psychiatrists (Eighth Edition)*: Elsevier; 2017. p. 105-49.
150. Yokomizo JE, Simon SS, de Campos Bottino CM. Cognitive screening for dementia in primary care: a systematic review. *International psychogeriatrics*. 2014;26(11):1783-804.
151. Carmona Calvo J, García-Cubillana de la Cruz P, Millán Carrasco A, Huizing E, Fernández Regidor G, Rojo Villalba M, et al. III Plan Integral de Salud Mental de Andalucía: 2016-2020. 2016.
152. Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005–2010. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2012;71(4):266-73.
153. Crutch SJ, Lehmann M, Schott JM, Rabinovici GD, Rossor MN, Fox NC. Posterior cortical atrophy. *The Lancet Neurology*. 2012;11(2):170-8.
154. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack Jr CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*. 2011;7(3):263-9.
155. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Focus*. 2013;11(1):96-106.
156. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*. 2011;7(3):280-92.
157. Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018;14(4):535-62.
158. Xiao X, Liu H, Liu X, Zhang W, Zhang S, Jiao B. APP, PSEN1, and PSEN2 Variants in Alzheimer's Disease: Systematic Re-evaluation According to ACMG Guidelines. *Frontiers in aging neuroscience*. 2021;13:695808.
159. Champion D, Pottier C, Nicolas G, Le Guennec K, Rovelet-Lecrux A. Alzheimer disease: modeling an A β -centered biological network. *Mol Psychiatry*. 2016;21(7):861-71.
160. Lladó A, Molinuevo JL. Enfermedad de Alzheimer familiar. *Gastroenterología y Hepatología Continuada*. 2006;5(4):191-3.
161. Lanoiselée HM, Nicolas G, Wallon D, Rovelet-Lecrux A, Lacour M, Rousseau S, et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med*. 2017;14(3):e1002270.
162. Sellal F, Wallon D, Martinez-Almoyna L, Marelli C, Dhar A, Oesterlé H, et al. APP Mutations in Cerebral Amyloid Angiopathy with or without Cortical Calcifications: Report of Three Families and a Literature Review. *J Alzheimers Dis*. 2017;56(1):37-46.
163. Misra A, Chakrabarti SS, Gambhir IS. New genetic players in late-onset Alzheimer's disease: Findings of genome-wide association studies. *The Indian journal of medical research*. 2018;148(2):135.
164. Bellenguez C, Küçükali F, Jansen IE, Kleindam L, Moreno-Grau S, Amin N, et al. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nature Genetics*. 2022;54(4):412-36.
165. Lambert JC, Heath S, Even G, Champion D, Sleegers K, Hiltunen M, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009;41(10):1094-9.

166. Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2011;43(5):429-35.
167. Ghani M, Sato C, Kakhki EG, Gibbs JR, Traynor B, St George-Hyslop P, et al. Mutation analysis of the MS4A and TREM gene clusters in a case-control Alzheimer's disease data set. *Neurobiol Aging.* 2016;42:217.e7-.e13.
168. Ieguchi K, Maru Y. Roles of EphA1/A2 and ephrin-A1 in cancer. *Cancer Sci.* 2019;110(3):841-8.
169. Griciuc A, Patel S, Federico AN, Choi SH, Innes BJ, Oram MK, et al. TREM2 Acts Downstream of CD33 in Modulating Microglial Pathology in Alzheimer's Disease. *Neuron.* 2019;103(5):820-35.e7.
170. Xu W, Tan L, Yu JT. The Role of PICALM in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2015;52(1):399-413.
171. Zhu J, Liu X, Yin H, Gao Y, Yu H. Convergent lines of evidence support BIN1 as a risk gene of Alzheimer's disease. *Hum Genomics.* 2021;15(1):9.
172. Xue YY, Chen YH, Lin RR, Huang HF, Wu ZY, Tao QQ. Alzheimer's disease susceptibility locus in CD2AP is associated with increased cerebrospinal fluid tau levels in mild cognitive impairment. *Neurosci Lett.* 2022;771:136419.
173. Yao X, Risacher SL, Nho K, Saykin AJ, Wang Z, Shen L. Targeted genetic analysis of cerebral blood flow imaging phenotypes implicates the INPP5D gene. *Neurobiol Aging.* 2019;81:213-21.
174. Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet.* 2019;51(3):404-13.
175. Cao MY, Davidson D, Yu J, Latour S, Veillette A. Clnk, a novel SLP-76-related adaptor molecule expressed in cytokine-stimulated hemopoietic cells. *The Journal of experimental medicine.* 1999;190(10):1527-34.
176. Zhang X, Zou M, Wu Y, Jiang D, Wu T, Zhao Y, et al. Regulation of the Late Onset Alzheimer's Disease Associated HLA-DQA1/DRB1 Expression. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2022;37:15333175221085066.
177. Wetzel-Smith MK, Hunkapiller J, Bhangale TR, Srinivasan K, Maloney JA, Atwal JK, et al. A rare mutation in UNC5C predisposes to late-onset Alzheimer's disease and increases neuronal cell death. *Nat Med.* 2014;20(12):1452-7.
178. Neff RA, Wang M, Vatansever S, Guo L, Ming C, Wang Q, et al. Molecular subtyping of Alzheimer's disease using RNA sequencing data reveals novel mechanisms and targets. *Science Advances.* 2021;7(2):eabb5398.
179. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science.* 1993;261(5123):921-3.
180. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(5):1977-81.
181. Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, et al. ApoE promotes the proteolytic degradation of Aβ. *Neuron.* 2008;58(5):681-93.
182. Brody AH, Nies SH, Guan F, Smith LM, Mukherjee B, Salazar SA, et al. Alzheimer risk gene product Pyk2 suppresses tau phosphorylation and phenotypic effects of tauopathy. *Molecular Neurodegeneration.* 2022;17(1):32.
183. Jun GR, Chung J, Mez J, Barber R, Beecham GW, Bennett DA, et al. Transethnic genome-wide scan identifies novel Alzheimer's disease loci. *Alzheimers Dement.* 2017;13(7):727-38.
184. Cao H, Zhou X, Chen Y, Ip FCF, Chen Y, Lai NCH, et al. Association of SPI1 Haplotypes with Altered SPI1 Gene Expression and Alzheimer's Disease Risk. *J Alzheimers Dis.* 2022;86(4):1861-73.

185. Wang J, Yang L, Dong C, Wang J, Xu L, Qiu Y, et al. EED-mediated histone methylation is critical for CNS myelination and remyelination by inhibiting WNT, BMP, and senescence pathways. *Science Advances*. 2020;6(33):eaaz6477.
186. Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, et al. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(38):13461-6.
187. Eysert F, Coulon A, Boscher E, Vreux A-C, Flaig A, Mendes T, et al. Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner. *Molecular Psychiatry*. 2021;26(10):5592-607.
188. Rosenthal SL, Kamboh MI. Late-onset Alzheimer's disease genes and the potentially implicated pathways. *Current genetic medicine reports*. 2014;2(2):85-101.
189. Yuan XZ, Sun S, Tan CC, Yu JT, Tan L. The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;58(2):303-22.
190. Marioni RE, Harris SE, Zhang Q, McRae AF, Hagenaars SP, Hill WD, et al. Correction: GWAS on family history of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*. 2019;9(1):161.
191. Zuroff LR, Torbati T, Hart NJ, Fuchs DT, Sheyn J, Rentsendorj A, et al. Effects of IL-34 on Macrophage Immunological Profile in Response to Alzheimer's-Related A β (42) Assemblies. *Front Immunol*. 2020;11:1449.
192. Tsai AP, Dong C, Lin PB-C, Messenger EJ, Casali BT, Moutinho M, et al. PLCG2 is associated with the inflammatory response and is induced by amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Genome Medicine*. 2022;14(1):1-13.
193. Lambert J-C, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature genetics*. 2013;45(12):1452-8.
194. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell*. 2017;169(6):985-99.
195. McLeod F, Salinas PC. Wnt proteins as modulators of synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*. 2018;53:90-5.
196. Chacón MA, Varela-Nallar L, Inestrosa NC. Frizzled-1 is involved in the neuroprotective effect of Wnt3a against A β oligomers. *J Cell Physiol*. 2008;217(1):215-27.
197. Karahan H, Smith DC, Kim B, Dabin LC, Al-Amin MM, Wijeratne HRS, et al. Deletion of *Abi3* gene locus exacerbates neuropathological features of Alzheimer's disease in a mouse model of A β ; amyloidosis. *Science Advances*. 2021;7(45):eabe3954.
198. Niu LD, Yin R, Li JQ, Cao XP, Yu JT, Tan L. Common Variants in *ABI3* Influence Cerebrospinal Fluid Total Tau Levels and Cognitive Decline in Progressive Mild Cognitive Impairment Patients. *J Alzheimers Dis*. 2019;70(1):17-23.
199. Barron AM, Garcia-Segura LM, Caruso D, Jayaraman A, Lee JW, Melcangi RC, et al. Ligand for translocator protein reverses pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2013;33(20):8891-7.
200. Cuddy LK, Prokopenko D, Cunningham EP, Brimberry R, Song P, Kirchner R, et al. A β -accelerated neurodegeneration caused by Alzheimer's-associated ACE variant R1279Q is rescued by angiotensin system inhibition in mice. *Sci Transl Med*. 2020;12(563).
201. Jochemsen HM, Teunissen CE, Ashby EL, van der Flier WM, Jones RE, Geerlings MI, et al. The association of angiotensin-converting enzyme with biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2014;6(3):27.
202. Hassan M, Shahzadi S, Alashwal H, Zaki N, Seo SY, Moustafa AA. Exploring the mechanistic insights of Cas scaffolding protein family member 4 with protein tyrosine kinase 2 in Alzheimer's disease by evaluating protein interactions through molecular docking and dynamic simulations. *Neurol Sci*. 2018;39(8):1361-74.
203. Beck TN, Nicolas E, Kopp MC, Golemis EA. Adaptors for disorders of the brain? The cancer signaling proteins NEDD9, CASS4, and PTK2B in Alzheimer's disease. *Oncoscience*. 2014;1(7):486-503.

204. Gurses MS, Ural MN, Gulec MA, Akyol O, Akyol S. Pathophysiological Function of ADAMTS Enzymes on Molecular Mechanism of Alzheimer's Disease. *Aging Dis.* 2016;7(4):479-90.
205. Abali O, Gokce EC, Cemil B, Erdogan B, Yonezawa T, Demircan K. Early induction of ADAMTS 1, -4, -5 and -9 in IL-stimulated mouse astrocytes. *Turk Neurosurg.* 2014;24(4):519-24.
206. Aging Nlo. What Happens to the Brain in Alzheimer's Disease? 2017.
207. Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, LoTurco JJ, Selkoe DJ. A critical function for β -amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *Journal of Neuroscience.* 2007;27(52):14459-69.
208. Müller UC, Deller T. The Physiological Functions of the APP Gene Family. *Frontiers Media SA;* 2017. p. 334.
209. Coronel R, Palmer C, Bernabeu-Zornoza A, Monteagudo M, Rosca A, Zambrano A, et al. Physiological effects of amyloid precursor protein and its derivatives on neural stem cell biology and signaling pathways involved. *Neural Regen Res.* 2019;14(10):1661-71.
210. Hesse R, von Einem B, Wagner F, Bott P, Schwanzar D, Jackson RJ, et al. sAPP β and sAPP α increase structural complexity and E/I input ratio in primary hippocampal neurons and alter Ca²⁺ homeostasis and CREB1-signaling. *Experimental neurology.* 2018;304:1-13.
211. Van Der Kant R, Goldstein LS. Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Developmental cell.* 2015;32(4):502-15.
212. Hur J-Y. γ -Secretase in Alzheimer's disease. *Experimental & Molecular Medicine.* 2022;54(4):433-46.
213. Zhang Z, Song M, Liu X, Su Kang S, Duong DM, Seyfried NT, et al. Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nature communications.* 2015;6(1):1-16.
214. Basurto-Islas G, Gu J-h, Tung YC, Liu F, Iqbal K. Mechanism of tau hyperphosphorylation involving lysosomal enzyme asparagine endopeptidase in a mouse model of brain ischemia. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2018;63(2):821-33.
215. Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepian SV, Chafai M, Kootar S, et al. η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature.* 2015;526(7573):443-7.
216. Koppaka V, Axelsen PH. Accelerated accumulation of amyloid β proteins on oxidatively damaged lipid membranes. *Biochemistry.* 2000;39(32):10011-6.
217. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* 2012;71(5):362-81.
218. Friedrich RP, Tepper K, Rönicke R, Soom M, Westermann M, Reymann K, et al. Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of Abeta pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(5):1942-7.
219. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2011;1(1):a006189.
220. Iribarren P, Chen K, Hu J, Gong W, Cho EH, Lockert S, et al. CpG-containing oligodeoxynucleotide promotes microglial cell uptake of amyloid β 1–42 peptide by up-regulating the expression of the G-protein-coupled receptor mFPR2. *The FASEB Journal.* 2005;19(14):2032-4.
221. Yang C-N, Shiao Y-J, Shie F-S, Guo B-S, Chen P-H, Cho C-Y, et al. Mechanism mediating oligomeric A β clearance by naïve primary microglia. *Neurobiology of disease.* 2011;42(3):221-30.
222. Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, Mullin K, et al. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron.* 2013;78(4):631-43.
223. Yamanaka M, Ishikawa T, Griep A, Axt D, Kummer MP, Heneka MT. PPAR γ /RXR α -induced and CD36-mediated microglial amyloid- β phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *Journal of Neuroscience.* 2012;32(48):17321-31.

224. Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE. A cell surface receptor complex for fibrillar β -amyloid mediates microglial activation. *Journal of Neuroscience*. 2003;23(7):2665-74.
225. Hartz AM, Miller DS, Bauer B. Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid- β in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular pharmacology*. 2010;77(5):715-23.
226. Orr ME, Sullivan AC, Frost B. A brief overview of tauopathy: causes, consequences, and therapeutic strategies. *Trends in pharmacological sciences*. 2017;38(7):637-48.
227. Noble W, Hanger DP, Miller CC, Lovestone S. The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Frontiers in neurology*. 2013;4:83.
228. Arendt T, Stieler JT, Holzer M. Tau and tauopathies. *Brain research bulletin*. 2016;126:238-92.
229. Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Döring F, Mandelkow E, Biernat J, Goris J, et al. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *The EMBO journal*. 1992;11(6):2131-8.
230. Reynolds CH, Utton MA, Gibb GM, Yates A, Anderton BH. Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-Terminal Kinase Phosphorylates τ Protein. *Journal of neurochemistry*. 1997;68(4):1736-44.
231. Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion J-P, Anderton BH. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neuroscience letters*. 1992;147(1):58-62.
232. Domise M, Didier S, Marinangeli C, Zhao H, Chandakkar P, Buée L, et al. AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-12.
233. Kimura T, Ishiguro K, Hisanaga S-i. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2014;7:65.
234. Jicha GA, Donnell AO, Weaver C, Angeletti R, Davies P. Hierarchical phosphorylation of recombinant tau by the paired-helical filament-associated protein kinase is dependent on cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of neurochemistry*. 1999;72(1):214-24.
235. Di J, Cohen L, Corbo C, Phillips GR, El Idrissi A, Alonso AD. Abnormal tau induces cognitive impairment through two different mechanisms: synaptic dysfunction and neuronal loss. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-12.
236. Alvarez G, Muñoz-Montaña JR, Satrustegui J, Avila J, Bogónez E, Díaz-Nido J. Lithium protects cultured neurons against β -amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS letters*. 1999;453(3):260-4.
237. Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *Journal of Neuroscience*. 1992;12(2):376-89.
238. Lee M-s, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai L-H. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*. 2000;405(6784):360-4.
239. Arispe N, Rojas E, Pollard HB. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(2):567-71.
240. Cho J-H, Johnson GV. Glycogen synthase kinase 3 β induces caspase-cleaved tau aggregation in situ. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(52):54716-23.
241. Binder LI, Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Berry RW. Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2005;1739(2-3):216-23.
242. Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, et al. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nature medicine*. 1996;2(7):788-94.

243. Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(19):12845-52.
244. Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2011;70(11):960-9.
245. van der Kant R, Goldstein LS, Ossenkoppele R. Amyloid- β -independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2020;21(1):21-35.
246. Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, et al. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol*. 2008;65(11):1509-17.
247. Villemagne VL, Pike KE, Ch telat G, Ellis KA, Mulligan RS, Bourgeat P, et al. Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2011;69(1):181-92.
248. Leroy K, Ando K, Laporte V, Dedecker R, Suain V, Authelet M, et al. Lack of tau proteins rescues neuronal cell death and decreases amyloidogenic processing of APP in APP/PS1 mice. *The American journal of pathology*. 2012;181(6):1928-40.
249. Fagan AM, Mintun MA, Shah AR, Aldea P, Roe CM, Mach RH, et al. Cerebrospinal fluid tau and ptau181 increase with cortical amyloid deposition in cognitively normal individuals: implications for future clinical trials of Alzheimer's disease. *EMBO molecular medicine*. 2009;1(8-9):371-80.
250. Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, Johnson KA, Dickerson BC, Goedert M. Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015;41(1):24-46.
251. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2015;14(4):388-405.
252. McQuade A, Blurton-Jones M. Microglia in Alzheimer's disease: exploring how genetics and phenotype influence risk. *Journal of molecular biology*. 2019;431(9):1805-17.
253. Boza-Serrano A, Yang Y, Paulus A, Deierborg T. Innate immune alterations are elicited in microglial cells before plaque deposition in the Alzheimer's disease mouse model 5xFAD. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-16.
254. Sosna J, Philipp S, Albay R, Reyes-Ruiz JM, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM, et al. Early long-term administration of the CSF1R inhibitor PLX3397 ablates microglia and reduces accumulation of intraneuronal amyloid, neuritic plaque deposition and pre-fibrillar oligomers in 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*. 2018;13(1):1-11.
255. Kummer MP, Hammerschmidt T, Martinez A, Terwel D, Eichele G, Witten A, et al. Ear2 deletion causes early memory and learning deficits in APP/PS1 mice. *Journal of Neuroscience*. 2014;34(26):8845-54.
256. Ruitenbergh A, Den Heijer T, Bakker SL, Van Swieten JC, Koudstaal PJ, Hofman A, et al. Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: the Rotterdam Study. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 2005;57(6):789-94.
257. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5(5):347-60.
258. Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang H-Y, Ahima RS, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nature Reviews Neurology*. 2018;14(3):168-81.
259. De Felice FG, Gonçalves RA, Ferreira ST. Impaired insulin signalling and allostatic load in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2022;23(4):215-30.
260. Skeberdis VA, Lan J-y, Zheng X, Zukin RS, Bennett MV. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(6):3561-6.

261. Liu L, Brown III JC, Webster WW, Morrisett RA, Monaghan DT. Insulin potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity in *Xenopus* oocytes and rat hippocampus. *Neuroscience letters*. 1995;192(1):5-8.
262. Passafaro M, Pièch V, Sheng M. Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nature neuroscience*. 2001;4(9):917-26.
263. López-Gamero 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;8(9).
264. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(1):a009191.
265. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends in cell biology*. 2002;12(2):65-71.
266. Lizcano JM, Alessi DR. The insulin signalling pathway. *Current biology : CB*. 2002;12(7):R236-8.
267. Femminella GD, Livingston NR, Raza S, Van Der Doef T, Frangou E, Love S, et al. Does insulin resistance influence neurodegeneration in non-diabetic Alzheimer's subjects? *Alzheimer's research & therapy*. 2021;13(1):1-11.
268. Tramutola A, Triplett JC, Di Domenico F, Niedowicz DM, Murphy MP, Coccia R, et al. Alteration of mTOR signaling occurs early in the progression of Alzheimer disease (AD): analysis of brain from subjects with pre-clinical AD, amnesic mild cognitive impairment and late-stage AD. *Journal of neurochemistry*. 2015;133(5):739-49.
269. Barone E, Di Domenico F, Cassano T, Arena A, Tramutola A, Lavecchia MA, et al. Impairment of biliverdin reductase-A promotes brain insulin resistance in Alzheimer disease: A new paradigm. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;91:127-42.
270. Barone E, Di Domenico F, Cenini G, Sultana R, Cini C, Preziosi P, et al. Biliverdin reductase-A protein levels and activity in the brains of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2011;1812(4):480-7.
271. Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, Brito-Moreira J, Houzel J-C, Decker H, et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(4):1339-53.
272. Pitt J, Thorner M, Brautigam 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.
273. Chatterjee S, Ambegaokar SS, Jackson GR, Mudher A. Insulin-mediated changes in tau hyperphosphorylation and autophagy in a *Drosophila* model of tauopathy and neuroblastoma cells. *Frontiers in neuroscience*. 2019;13:801.
274. Gratuze M, Julien J, Petry FR, Morin F, Planel E. Insulin deprivation induces PP2A inhibition and tau hyperphosphorylation in hTau mice, a model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1-13.
275. Whitmer RA, Gunderson EP, Barrett-Connor E, Quesenberry CP, Yaffe K. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *Bmj*. 2005;330(7504):1360.
276. O Akinyemi R, B Mukaetova-Ladinska E, Attems J, Ihara M, N Kalaria R. Vascular risk factors and neurodegeneration in ageing related dementias: Alzheimer's disease and vascular dementia. *Current Alzheimer Research*. 2013;10(6):642-53.
277. Vidoni ED, Townley RA, Honea RA, Burns JM. Alzheimer disease biomarkers are associated with body mass index. *Neurology*. 2011;77(21):1913-20.
278. Kang SH, Kim JH, Chang Y, Cheon BK, Choe YS, Jang H, et al. Independent effect of body mass index variation on amyloid- β positivity. *Frontiers in aging neuroscience*. 2022;14.

279. Bell SP, Liu D, Samuels LR, Shah AS, Gifford KA, Hohman TJ, et al. Late-Life Body Mass Index, Rapid Weight Loss, Apolipoprotein E ϵ 4 and the Risk of Cognitive Decline and Incident Dementia. *J Nutr Health Aging*. 2017;21(10):1259-67.
280. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell metabolism*. 2008;7(1):45-56.
281. Sánchez-Archidona AR, Cruciani-Guglielmacci C, Roujeau C, Wigger L, Lallement J, Denom J, et al. Plasma triacylglycerols are biomarkers of β -cell function in mice and humans. *Molecular metabolism*. 2021;54:101355.
282. Roberts RO, Knopman DS, Przybelski SA, Mielke MM, Kantarci K, Preboske GM, et al. Association of type 2 diabetes with brain atrophy and cognitive impairment. *Neurology*. 2014;82(13):1132-41.
283. Antal B, McMahon LP, Sultan SF, Lithen A, Wexler DJ, Dickerson B, et al. Type 2 diabetes mellitus accelerates brain aging and cognitive decline: Complementary findings from UK Biobank and meta-analyses. *eLife*. 2022;11:e73138.
284. Hoscheidt SM, Kellawan JM, Berman SE, Rivera-Rivera LA, Krause RA, Oh JM, et al. Insulin resistance is associated with lower arterial blood flow and reduced cortical perfusion in cognitively asymptomatic middle-aged adults. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2017;37(6):2249-61.
285. Lourenco CF, Ledo A, Barbosa RM, Laranjinha J. Neurovascular uncoupling in the triple transgenic model of Alzheimer's disease: Impaired cerebral blood flow response to neuronal-derived nitric oxide signaling. *Experimental neurology*. 2017;291:36-43.
286. Duan Y, Zeng L, Zheng C, Song B, Li F, Kong X, et al. Inflammatory links between high fat diets and diseases. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2649.
287. Vidoni E, Townley R, Honea R, Burns J, Initiative AsDN. Alzheimer disease biomarkers are associated with body mass index. *Neurology*. 2011;77(21):1913-20.
288. Wolf-Klein GP, Silverstone FA, Lansey SC, Tesi D, Ciampaglia C, O'Donnell M, et al. Energy requirements in Alzheimer's disease patients. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 1995;11(3):264-8.
289. Poehlman E, Toth M, Goran M, Carpenter W, Newhouse P, Rosen C. Daily energy expenditure in free-living non-institutionalized Alzheimer's patients: A doubly labeled water study. *Neurology*. 1997;48(4):997-1002.
290. Van Erum J, Van Dam D, De Deyn PP. Sleep and Alzheimer's disease: a pivotal role for the suprachiasmatic nucleus. *Sleep Medicine Reviews*. 2018;40:17-27.
291. Ishii M, Iadecola C. Metabolic and non-cognitive manifestations of Alzheimer's disease: the hypothalamus as both culprit and target of pathology. *Cell metabolism*. 2015;22(5):761-76.
292. Adachi Y, Ota K, Minami I, Yamada T, Watanabe T. Lower insulin secretion is associated with hippocampal and parahippocampal gyrus atrophy in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Investigation*. 2021;12(10):1908-13.
293. Li H, Zhu H, Wallack M, Mwamburi M, Abdul-Hay SO, Leissring MA, et al. Age and its association with low insulin and high amyloid- β peptides in blood. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016;49(1):129-37.
294. Byun MS, Kim HJ, Yi D, Choi HJ, Baek H, Lee JH, et al. Differential effects of blood insulin and HbA1c on cerebral amyloid burden and neurodegeneration in nondiabetic cognitively normal older adults. *Neurobiology of aging*. 2017;59:15-21.
295. Lacy ME, Gilsanz P, Karter AJ, Quesenberry CP, Pletcher MJ, Whitmer RA. Long-term glycemic control and dementia risk in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2018;41(11):2339-45.
296. Kulas JA, Puig KL, Combs CK. Amyloid precursor protein in pancreatic islets. *Journal of Endocrinology*. 2017;235(1):49-67.
297. Boskey AL, Imbert L. Bone quality changes associated with aging and disease: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017;1410(1):93-106.

298. Chang K-H, Chung C-J, Lin C-L, Sung F-C, Wu T-N, Kao C-H. Increased risk of dementia in patients with osteoporosis: a population-based retrospective cohort analysis. *Age*. 2014;36(2):967-75.
299. Roos PM. Osteoporosis in neurodegeneration. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2014;28(4):418-21.
300. Dengler-Crish CM, Smith MA, Wilson GN. Early Evidence of Low Bone Density and Decreased Serotonergic Synthesis in the Dorsal Raphe of a Tauopathy Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;55(4):1605-19.
301. Peng Y, Liu J, Tang Y, Liu J, Han T, Han S, et al. High-fat-diet-induced weight gain ameliorates bone loss without exacerbating A β PP processing and cognition in female APP/PS1 mice. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:225.
302. Amouzougan A, Lafaie L, Marotte H, Dénarié D, Collet P, Pallot-Prades B, et al. High prevalence of dementia in women with osteoporosis. *Joint bone spine*. 2017;84(5):611-4.
303. Shao H, Breitner JC, Whitmer RA, Wang J, Hayden K, Wengreen H, et al. Hormone therapy and Alzheimer disease dementia: new findings from the Cache County Study. *Neurology*. 2012;79(18):1846-52.
304. Henderson VW, Benke K, Green R, Cupples L, Farrer L. Postmenopausal hormone therapy and Alzheimer's disease risk: interaction with age. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2005;76(1):103-5.
305. Hara Y, Yuk F, Puri R, Janssen WG, Rapp PR, Morrison JH. Presynaptic mitochondrial morphology in monkey prefrontal cortex correlates with working memory and is improved with estrogen treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(1):486-91.
306. Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD. Decline in mitochondrial bioenergetics and shift to ketogenic profile in brain during reproductive senescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2010;1800(10):1121-6.
307. Ratnakumar A, Zimmerman SE, Jordan BA, Mar JC. Estrogen activates Alzheimer's disease genes. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2019;5:906-17.
308. Short RA, O'Brien PC, Graff-Radford NR, Bowen RL, editors. *Elevated gonadotropin levels in patients with Alzheimer disease*. Mayo Clinic Proceedings; 2001: Elsevier.
309. Bowen R, Isley J, Atkinson R. An association of elevated serum gonadotropin concentrations and Alzheimer disease? *Journal of neuroendocrinology*. 2000;12(4):351-4.
310. Randolph Jr JF, Zheng H, Sowers MR, Crandall C, Crawford S, Gold EB, et al. Change in follicle-stimulating hormone and estradiol across the menopausal transition: effect of age at the final menstrual period. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(3):746-54.
311. Imtiaz B, Tuppurainen M, Rikkinen T, Kivipelto M, Soininen H, Kröger H, et al. Postmenopausal hormone therapy and Alzheimer disease: a prospective cohort study. *Neurology*. 2017;88(11):1062-8.
312. Tamaki C, Ohtsuki S, Iwatsubo T, Hashimoto T, Yamada K, Yabuki C, et al. Major involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in the clearance of plasma free amyloid β -peptide by the liver. *Pharmaceutical research*. 2006;23(7):1407-16.
313. Kanekiyo T, Bu G. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- β clearance in Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*. 2014;6:93.
314. Wang Y-R, Wang Q-H, Zhang T, Liu Y-H, Yao X-Q, Zeng F, et al. Associations between hepatic functions and plasma amyloid-beta levels—implications for the capacity of liver in peripheral amyloid-beta clearance. *Molecular neurobiology*. 2017;54(3):2338-44.
315. Hone E, Martins LJ, Fonte J, Martins RN. Apolipoprotein E influences amyloid-beta clearance from the murine periphery. *J Alzheimers Dis*. 2003;5(1):1-8.
316. Mohamed LA, Kaddoumi A. In vitro investigation of amyloid- β hepatobiliary disposition in sandwich-cultured primary rat hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*. 2013;41(10):1787-96.

317. Cheng Y, Tian D-Y, Wang Y-J. Peripheral clearance of brain-derived A β in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic perspectives. *Translational Neurodegeneration*. 2020;9(1):1-11.
318. Tamaki C, Ohtsuki S, Terasaki T. Insulin facilitates the hepatic clearance of plasma amyloid β -peptide (1–40) by intracellular translocation of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) to the plasma membrane in hepatocytes. *Molecular pharmacology*. 2007;72(4):850-5.
319. Estrada LD, Ahumada P, Cabrera D, Arab JP. Liver dysfunction as a novel player in Alzheimer's progression: looking outside the brain. *Frontiers in aging neuroscience*. 2019;11:174.
320. Kellar D, Lockhart S, Aisen P, Raman R, Rissman R, Brewer J, et al. Intranasal insulin reduces white matter hyperintensity progression in association with improvements in cognition and CSF biomarker profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*. 2021;8(3):240-8.
321. Craft S, Raman R, Chow TW, Rafii MS, Sun C-K, Rissman RA, et al. Safety, efficacy, and feasibility of intranasal insulin for the treatment of mild cognitive impairment and Alzheimer disease dementia: a randomized clinical trial. *JAMA neurology*. 2020;77(9):1099-109.
322. Luchsinger JA, Perez T, Chang H, Mehta P, Steffener J, Pradabhan G, et al. Metformin in amnesic mild cognitive impairment: results of a pilot randomized placebo controlled clinical trial. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016;51(2):501-14.
323. Zhang J, Lin Y, Dai X, Fang W, Wu X, Chen X. Metformin treatment improves the spatial memory of aged mice in an APOE genotype-dependent manner. *The FASEB Journal*. 2019;33(6):7748-57.
324. Gold M, Alderton C, Zvartau-Hind M, Egginton S, Saunders AM, Irizarry M, et al. Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate Alzheimer's disease: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2010;30(2):131-46.
325. Abbatecola AM, Lattanzio F, Molinari AM, Cioffi M, Mansi L, Rambaldi P, et al. Rosiglitazone and cognitive stability in older individuals with type 2 diabetes and mild cognitive impairment. *Diabetes Care*. 2010;33(8):1706-11.
326. Hanyu H, Sato T, Kiuchi A, Sakurai H, Iwamoto T. Pioglitazone improved cognition in a pilot study on patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with diabetes mellitus. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2009;57(1):177-9.
327. Reger MA, Watson G, Green PS, Baker LD, Cholerton B, Fishel MA, et al. Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid- β in memory-impaired older adults. *Journal of Alzheimer's disease*. 2008;13(3):323-31.
328. Claxton A, Baker LD, Hanson A, Trittschuh EH, Cholerton B, Morgan A, et al. Long-acting intranasal insulin detemir improves cognition for adults with mild cognitive impairment or early-stage Alzheimer's disease dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015;44(3):897-906.
329. Hallschmid M. Intranasal insulin for Alzheimer's disease. *CNS drugs*. 2021;35(1):21-37.
330. Mannucci E, Dicembrini I. Drugs for type 2 diabetes: role in the regulation of bone metabolism. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 2015;12(2):130.
331. Ott V, Lehnert H, Staub J, Wönne K, Born J, Hallschmid M. Central nervous insulin administration does not potentiate the acute glucoregulatory impact of concurrent mild hyperinsulinemia. *Diabetes*. 2015;64(3):760-5.
332. Benedict C, Dodt C, Hallschmid M, Lepiorz M, Fehm HL, Born J, et al. Immediate but not long-term intranasal administration of insulin raises blood pressure in human beings. *Metabolism*. 2005;54(10):1356-61.
333. Navarro JA, Decara J, Medina-Vera D, Tovar R, Suarez J, Pavón J, et al. 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(7):2030.

334. Fortis-Barrera Á, Alarcón-Aguilar FJ, Banderas-Dorantes T, Díaz-Flores M, Román-Ramos R, Cruz M, et al. C ucurbita ficifolia Bouché (Cucurbitaceae) and D-chiro-inositol modulate the redox state and inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;65(10):1563-76.
335. Head E. A canine model of human aging and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013;1832(9):1384-9.
336. Braak H, Braak E, Strothjohann M. Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. *Neuroscience letters*. 1994;171(1-2):1-4.
337. Rosen RF, Farberg AS, Gearing M, Dooyema J, M. Long P, Anderson DC, et al. Tauopathy with paired helical filaments in an aged chimpanzee. *Journal of Comparative Neurology*. 2008;509(3):259-70.
338. Steffen J, Krohn M, Paarmann K, Schwitlick C, Brüning T, Marreiros R, et al. Revisiting rodent models: Octodon degus as Alzheimer's disease model? *Acta Neuropathologica Communications*. 2016;4(1):1-11.
339. Castro-Fuentes R, Socas-Pérez R. Octodon degus: a strong attractor for Alzheimer research. *Basic and Clinical Neuroscience*. 2013;4(1):91.
340. Cotman CW, Head E. The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2008;15(4):685-707.
341. National Academies of Sciences E, Medicine. Necessity, Use, and Care of Laboratory Dogs at the US Department of Veterans Affairs. 2020.
342. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39(3):409-21.
343. Billings LM, Oddo S, Green KN, McLaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*. 2005;45(5):675-88.
344. Bales KR. The value and limitations of transgenic mouse models used in drug discovery for Alzheimer's disease: an update. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2012;7(4):281-97.
345. Oblak AL, Forner S, Territo PR, Sasner M, Carter GW, Howell GR, et al. Model organism development and evaluation for late-onset Alzheimer's disease: MODEL-AD. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2020;6(1):e12110.
346. Devi L, Ohno M. Phospho-eIF2 α level is important for determining abilities of BACE1 reduction to rescue cholinergic neurodegeneration and memory defects in 5XFAD mice. *PLoS one*. 2010;5(9):e12974.
347. Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2012;33(1):196. e29-. e40.
348. O'Leary TP, Mantolino HM, Stover KR, Brown RE. Age-related deterioration of motor function in male and female 5xFAD mice from 3 to 16 months of age. *Genes, Brain and Behavior*. 2020;19(3):e12538.
349. Oblak AL, Lin PB, Kotredes KP, Pandey RS, Garceau D, Williams HM, et al. Comprehensive evaluation of the 5XFAD mouse model for preclinical testing applications: a MODEL-AD study. *Frontiers in aging neuroscience*. 2021;13:713726.
350. Gendron WH, Fertan E, Pelletier S, Roddick KM, O'Leary TP, Anini Y, et al. Age related weight loss in female 5xFAD mice from 3 to 12 months of age. *Behavioural Brain Research*. 2021;406:113214.
351. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of bone and mineral research*. 2010;25(7):1468-86.

352. Jansen T, Daiber A. Direct antioxidant properties of bilirubin and biliverdin. Is there a role for biliverdin reductase? *Frontiers in Pharmacology*. 2012;3:30.
353. Caputo M, Bona E, Leone I, Samà M, Nuzzo A, Ferrero A, et al. Inositols and metabolic disorders: From farm to bedside. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2020;10(3):252-9.
354. Yap A, Nishiumi S, Yoshida K-i, 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):103-8.
355. 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 hypertension*. 2017;10:107-12.
356. Dang NT, Mukai R, Yoshida K-i, Ashida H. D-pinitol and myo-inositol stimulate translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle of C57BL/6 mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2010;74(5):1062-7.
357. Brandscheid C, Schuck F, Reinhardt S, Schäfer K-H, Pietrzik CU, Grimm M, et al. Altered gut microbiome composition and tryptic activity of the 5xFAD Alzheimer's mouse model. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017;56(2):775-88.
358. Reitz C, Tang M-X, Luchsinger J, Mayeux R. Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. *Archives of neurology*. 2004;61(5):705-14.
359. López-Gamero AJ, Pacheco-Sánchez B, Rosell-Valle C, Medina-Vera D, Navarro JA, del Mar Fernández-Arjona M, et al. Dietary administration of D-chiro-inositol attenuates sex-specific metabolic imbalances in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;150:112994.
360. Zhang Y, Zhou B, Deng B, Zhang F, Wu J, Wang Y, et al. Amyloid- β induces hepatic insulin resistance in vivo via JAK2. *Diabetes*. 2013;62(4):1159-66.
361. Romero-Díaz C, Duarte-Montero D, Gutiérrez-Romero SA, Mendivil CO. Diabetes and bone fragility. *Diabetes Therapy*. 2021;12(1):71-86.
362. Papaioannou I, Pantazidou G, Kokkalis Z, Georgopoulos N, Jelastopulu E. Systematic Review: Are the Elderly With Diabetes Mellitus Type 2 Prone to Fragility Fractures? *Cureus*. 2021;13(4).
363. Rönnemaa E, Zethelius B, Sundelöf J, Sundström J, Degerman-Gunnarsson M, Berne C, et al. Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease. *Neurology*. 2008;71(14):1065-71.
364. Ma J, Zhang W, Wang HF, Wang ZX, Jiang T, Tan MS, et al. Peripheral Blood Adipokines and Insulin Levels in Patients with Alzheimer's Disease: A Replication Study and Meta-Analysis. *Curr Alzheimer Res*. 2016;13(3):223-33.
365. Kellar D, Lockhart SN, Aisen P, Raman R, Rissman RA, Brewer J, et al. Intranasal Insulin Reduces White Matter Hyperintensity Progression in Association with Improvements in Cognition and CSF Biomarker Profiles in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimers Dis*. 2021;8(3):240-8.
366. Craft S, Raman R, Chow TW, Rafii MS, Sun CK, Rissman RA, et al. Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*. 2020;77(9):1099-109.
367. Luchsinger JA, Perez T, Chang H, Mehta P, Steffener J, Pradabhan G, et al. Metformin in Amnesic Mild Cognitive Impairment: Results of a Pilot Randomized Placebo Controlled Clinical Trial. *J Alzheimers Dis*. 2016;51(2):501-14.
368. 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. *Journal of medicinal chemistry*. 2003;46(15):3283-91.
369. Matsuzaki S, Eyster C, Newhardt MF, Giorgione JR, Kinter C, Young ZT, et al. Insulin signaling alters antioxidant capacity in the diabetic heart. *Redox biology*. 2021;47:102140.

370. Simic D, Nikolic Turnic T, Dimitrijevic A, Zivadinovic A, Milosevic-Stevanovic J, Djuric D, et al. Potential role of d-chiro-inositol in reducing oxidative stress in the blood of nonobese women with polycystic ovary syndrome. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2022;100(7):629-36.
371. 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. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2019;68:33-41.
372. Hawkes CA, Deng LH, Shaw JE, Nitz M, McLaurin J. Small molecule β -amyloid inhibitors that stabilize protofibrillar structures in vitro improve cognition and pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*. 2010;31(2):203-13.
373. Li G, Rauscher S, Baud S, Pomes R. Binding of inositol stereoisomers to model amyloidogenic peptides. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2012;116(3):1111-9.
374. Li G, Pomès Rg. Binding mechanism of inositol stereoisomers to monomers and aggregates of A β (16-22). *The Journal of Physical Chemistry B*. 2013;117(22):6603-13.
375. Shaw J, Chio J, Dasgupta S, Lai A, Mo G, Pang F, et al. A β (1-42) assembly in the presence of scyllo-inositol derivatives: identification of an oxime linkage as important for the development of assembly inhibitors. *ACS chemical neuroscience*. 2012;3(3):167-77.
376. 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 A β oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(6):1971-6.
377. Lee CM, Woodward M, Batty GD, Beiser AS, Bell S, Berr C, et al. Association of anthropometry and weight change with risk of dementia and its major subtypes: a meta-analysis consisting 2.8 million adults with 57 294 cases of dementia. *Obesity Reviews*. 2020;21(4):e12989.
378. Donini LM, Savina C, Cannella C. Eating habits and appetite control in the elderly: the anorexia of aging. *International psychogeriatrics*. 2003;15(1):73-87.
379. Rosa A, Isola R, Nieddu M, Masala C. The role of lipid composition in the sensory attributes and acceptability of the salted and dried mullet roes (bottarga): a study in human and animal models. *Nutrients*. 2020;12(11):3454.
380. Murphy C. The chemical senses and nutrition in older adults. *Journal of Nutrition for the Elderly*. 2008;27(3-4):247-65.
381. Serby M, Larson P, Kalkstein DS. The nature and course of olfactory deficits in Alzheimer's disease. *The American journal of psychiatry*. 1991.
382. Murphy C. Olfactory and other sensory impairments in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. 2019;15(1):11-24.
383. Roberts ER, Dossat AM, del Mar Cortijo M, Brundin P, Wesson DW. Alterations in odor hedonics in the 5XFAD Alzheimer's disease mouse model and the influence of sex. *Behavioral Neuroscience*. 2020;134(5):407.
384. O'Leary T, Stover K, Mantolino H, Darvesh S, Brown R. Intact olfactory memory in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease from 3 to 15 months of age. *Behavioural Brain Research*. 2020;393:112731.
385. Roddick KM, Roberts AD, Schellinck HM, Brown RE. Sex and genotype differences in odor detection in the 3 \times Tg-AD and 5XFAD mouse models of Alzheimer's disease at 6 months of age. *Chemical Senses*. 2016;41(5):433-40.
386. Xiao N-A, Zhang J, Zhou M, Wei Z, Wu X-L, Dai X-M, et al. Reduction of glucose metabolism in olfactory bulb is an earlier Alzheimer's disease-related biomarker in 5XFAD mice. *Chinese Medical Journal*. 2015;128(16):2220-7.
387. Robison LS, Gannon OJ, Thomas MA, Salinero AE, Abi-Ghanem C, Poitelon Y, et al. Role of sex and high-fat diet in metabolic and hypothalamic disturbances in the 3 \times Tg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*. 2020;17(1):1-20.

388. Joly-Amado A, Serraneau KS, Brownlow M, de Evsikova CM, Speakman JR, Gordon MN, et al. Metabolic changes over the course of aging in a mouse model of tau deposition. *Neurobiology of aging*. 2016;44:62-73.
389. Jul P, Volbracht C, de Jong IE, Helboe L, Elvang AB, Pedersen JT. Hyperactivity with agitative-like behavior in a mouse tauopathy model. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016;49(3):783-95.
390. Yoshikawa M, Soeda Y, Michikawa M, Almeida OF, Takashima A. Tau depletion in APP transgenic mice attenuates task-related hyperactivation of the hippocampus and differentially influences locomotor activity and spatial memory. *Frontiers in neuroscience*. 2018;12:124.
391. Huebbe P, Dose J, Schloesser A, Campbell G, Glüer CC, Gupta Y, et al. Apolipoprotein E (APOE) genotype regulates body weight and fatty acid utilization—studies in gene-targeted replacement mice. *Molecular nutrition & food research*. 2015;59(2):334-43.
392. Farmer BC, Williams HC, Devanney NA, Piron MA, Nation GK, Carter DJ, et al. APOE4 lowers energy expenditure in females and impairs glucose oxidation by increasing flux through aerobic glycolysis. *Molecular neurodegeneration*. 2021;16(1):1-18.
393. Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(1):153-62.
394. Marques F, Sousa JC, Sousa N, Palha JA. Blood–brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*. 2013;8(1):1-9.
395. Chaskiel L, Bristow AD, Bluthé RM, Dantzer R, Blomqvist A, Konsman JP. Interleukin-1 reduces food intake and body weight in rat by acting in the arcuate hypothalamus. *Brain, behavior, and immunity*. 2019;81:560-73.
396. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661-71.
397. Cone R, Cowley MA, Butler A, Fan W, Marks D, Low M. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity*. 2001;25(5):S63-S7.
398. López-Gambero AJ, Martínez F, Salazar K, Cifuentes M, Nualart F. Brain Glucose-Sensing Mechanism and Energy Homeostasis. *Molecular Neurobiology*. 2019;56(2):769-96.
399. Barson JR, Morganstern I, Leibowitz SF. Complementary roles of orexin and melanin-concentrating hormone in feeding behavior. *International journal of endocrinology*. 2013;2013:983964.
400. López-Gambero AJ, Rosell-Valle C, Medina-Vera D, Navarro JA, Vargas A, Rivera P, et al. A Negative Energy Balance Is Associated with Metabolic Dysfunctions in the Hypothalamus of a Humanized Preclinical Model of Alzheimer's Disease, the 5XFAD Mouse. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(10):5365.
401. Gendron WH, Fertan E, Pelletier S, Roddick KM, O'Leary TP, Anini Y, et al. Age related weight loss in female 5xFAD mice from 3 to 12 months of age. *Behav Brain Res*. 2021;406:113214.
402. Ishii M, Wang G, Racchumi G, Dyke JP, Iadecola C. Transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein exhibit early metabolic deficits and a pathologically low leptin state associated with hypothalamic dysfunction in arcuate neuropeptide Y neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34(27):9096-106.
403. Ishii M, Hiller AJ, Pham L, McGuire MJ, Iadecola C, Wang G. Amyloid-Beta Modulates Low-Threshold Activated Voltage-Gated L-Type Calcium Channels of Arcuate Neuropeptide Y Neurons Leading to Calcium Dysregulation and Hypothalamic Dysfunction. *J Neurosci*. 2019;39(44):8816-25.
404. Labandeira-Garcia JL, Costa-Besada MA, Labandeira CM, Villar-Cheda B, Rodríguez-Perez AI. Insulin-Like Growth Factor-1 and Neuroinflammation. *Frontiers in aging neuroscience*. 2017;9.

405. Varela-Rodríguez BM, Pena-Bello L, Juiz-Valiña P, Vidal-Bretal B, Cordido F, Sangiao-Alvarellos S. FNDC5 expression and circulating irisin levels are modified by diet and hormonal conditions in hypothalamus, adipose tissue and muscle. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-13.
406. Allan G, Mobbs C. Use of D-chiro-inositol in the treatment of conditions associated with hypothalamic gene expression. Google Patents; 2002.
407. Jeon Y, Aja S, Ronnett GV, Kim E-K. D-chiro-inositol glycan reduces food intake by regulating hypothalamic neuropeptide expression via AKT-FoxO1 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;470(4):818-23.
408. Zarezadeh M, Dehghani A, Faghfour AH, Radkhah N, Naemi Kermanshahi M, Hamed Kalajahi F, et al. Inositol supplementation and body mass index: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Obesity Science & Practice*. 2022.
409. Hussain S, Richardson E, Ma Y, Holton C, De Backer I, Buckley N, et al. Glucokinase activity in the arcuate nucleus regulates glucose intake. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(1):337-49.
410. Böttcher M, Müller-Fielitz H, Sundaram SM, Gallet S, Neve V, Shionoya K, et al. NF- κ B signaling in tanycytes mediates inflammation-induced anorexia. *Molecular metabolism*. 2020;39:101022.
411. Bobbo VC, Engel DF, Jara CP, Mendes NF, Haddad-Tovoli R, Prado TP, et al. Interleukin-6 actions in the hypothalamus protects against obesity and is involved in the regulation of neurogenesis. *Journal of Neuroinflammation*. 2021;18(1):192.
412. Madathil SK, Carlson SW, Brelsfoard JM, Ye P, D'Ercole AJ, Saatman KE. Astrocyte-specific overexpression of insulin-like growth factor-1 protects hippocampal neurons and reduces behavioral deficits following traumatic brain injury in mice. *PloS one*. 2013;8(6):e67204.
413. Okoreeh AK, Bake S, Sohrabji F. Astrocyte-specific insulin-like growth factor-1 gene transfer in aging female rats improves stroke outcomes. *Glia*. 2017;65(7):1043-58.
414. Lieb W, Beiser AS, Vasan RS, Tan ZS, Au R, Harris TB, et al. Association of plasma leptin levels with incident Alzheimer disease and MRI measures of brain aging. *Jama*. 2009;302(23):2565-72.
415. Hölscher C. Novel dual GLP-1/GIP receptor agonists show neuroprotective effects in Alzheimer's and Parkinson's disease models. *Neuropharmacology*. 2018;136(Pt B):251-9.
416. Matyi JM, Rattinger GB, Schwartz S, Buhusi M, Tschanz JT. Lifetime estrogen exposure and cognition in late life: the Cache County Study. *Menopause (New York, NY)*. 2019;26(12):1366.
417. Shumaker SA, Legault C, Kuller L, Rapp SR, Thal L, Lane DS, et al. Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study. *Jama*. 2004;291(24):2947-58.
418. Ge Y-J, Xu W, Tan C-C, Tan L. Blood-based biomarkers in hypothalamic-pituitary axes for the risk of dementia or cognitive decline: A systematic review and meta-analysis. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(20):20350.
419. He X-Y, Kuo K, Yang L, Zhang Y-R, Wu B-S, Chen S-D, et al. Serum clinical laboratory tests and risk of incident dementia: a prospective cohort study of 407,190 individuals. *Translational psychiatry*. 2022;12(1):1-8.
420. Velloso LA, Araújo EP, de Souza CT. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation*. 2008;15(3):189-93.
421. Lee Y-H, Hsu H-C, Kao P-C, Shiao Y-J, Yeh SH-H, Shie F-S, et al. Augmented Insulin and Leptin Resistance of High Fat Diet-Fed APPswe/PS1dE9 Transgenic Mice Exacerbate Obesity and Glycemic Dysregulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(8):2333.
422. McGuire MJ, Ishii M. Leptin Dysfunction and Alzheimer's Disease: Evidence from Cellular, Animal, and Human Studies. *Cellular and molecular neurobiology*. 2016;36(2):203-17.

423. Tramutola A, Arena A, Cini C, Butterfield DA, Barone E. Modulation of GLP-1 signaling as a novel therapeutic approach in the treatment of Alzheimer's disease pathology. *Expert review of neurotherapeutics*. 2017;17(1):59-75.
424. Zhang ZQ, Hölscher C. GIP has neuroprotective effects in Alzheimer and Parkinson's disease models. *Peptides*. 2020;125:170184.
425. Bonfili L, Cecarini V, Berardi S, Scarpona S, Suchodolski JS, Nasuti C, et al. Microbiota modulation counteracts Alzheimer's disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-21.
426. Park HK, Ahima RS. Resistin in rodents and humans. *Diabetes Metab J*. 2013;37(6):404-14.
427. Benomar Y, Amine H, Crépin D, Al Rifai S, Riffault L, Gertler A, et al. Central Resistin/TLR4 Impairs Adiponectin Signaling, Contributing to Insulin and FGF21 Resistance. *Diabetes*. 2016;65(4):913-26.
428. Singhal NS, Lazar MA, Ahima RS. Central Resistin Induces Hepatic Insulin Resistance via Neuropeptide Y. *The Journal of Neuroscience*. 2007;27(47):12924-32.
429. Demirci S, Aynalı A, Demirci K, Demirci S, Aridoğan BC. The Serum Levels of Resistin and Its Relationship with Other Proinflammatory Cytokines in Patients with Alzheimer's Disease. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2017;15(1):59-63.
430. Wilkinson M, Wilkinson D, Wiesner G, Morash B, Ur E. Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanostimulating hormone. *Neuroendocrinology*. 2005;81(1):19-30.
431. Kunath N, van Groen T, Allison DB, Kumar A, Dozier-Sharpe M, Kadish I. Ghrelin agonist does not foster insulin resistance but improves cognition in an Alzheimer's disease mouse model. *Scientific reports*. 2015;5:11452.
432. Al Massadi O, López M, Tschöp M, Diéguez C, Nogueiras R. Current Understanding of the Hypothalamic Ghrelin Pathways Inducing Appetite and Adiposity. *Trends Neurosci*. 2017;40(3):167-80.
433. Jeong YO, Shin SJ, Park JY, Ku BK, Song JS, Kim JJ, et al. MK-0677, a Ghrelin Agonist, Alleviates Amyloid Beta-Related Pathology in 5XFAD Mice, an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
434. Näsman B, Olsson T, Fagerlund M, Eriksson S, Viitanen M, Carlström K. Blunted adrenocorticotropin and increased adrenal steroid response to human corticotropin-releasing hormone in Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*. 1996;39(5):311-8.
435. Devesa J, Núñez I, Agra C, Bejarano A, Devesa P. Treatment with growth hormone (GH) increased the metabolic activity of the brain in an elder patient, not GH-deficient, who suffered mild cognitive alterations and had an ApoE 4/3 genotype. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(8):2294.
436. Baker LD, Barsness SM, Borson S, Merriam GR, Friedman SD, Craft S, et al. Effects of growth hormone-releasing hormone on cognitive function in adults with mild cognitive impairment and healthy older adults: results of a controlled trial. *Archives of neurology*. 2012;69(11):1420-9.
437. Van Osch LA, Hogervorst E, Combrinck M, Smith AD. Low thyroid-stimulating hormone as an independent risk factor for Alzheimer disease. *Neurology*. 2004;62(11):1967-71.
438. Rollero A, Murialdo G, Fonzi S, Garrone S, Gianelli MV, Gazzero E, et al. Relationship between cognitive function, growth hormone and insulin-like growth factor I plasma levels in aged subjects. *Neuropsychobiology*. 1998;38(2):73-9.
439. de Koning CH, Popp-Snijders C, Schoemaker J, Lambalk CB. Elevated FSH concentrations in imminent ovarian failure are associated with higher FSH and LH pulse amplitude and response to GnRH. *Human Reproduction*. 2000;15(7):1452-6.
440. Baliotti M, Giuli C, Fattoretti P, Fabbietti P, Papa R, Postacchini D, et al. Effect of a Comprehensive Intervention on Plasma BDNF in Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2017;57(1):37-43.

441. Maulik M, Westaway D, Jhamandas JH, Kar S. Role of cholesterol in APP metabolism and its significance in Alzheimer's disease pathogenesis. *Mol Neurobiol*. 2013;47(1):37-63.
442. Williamson R, Sutherland C. Neuronal membranes are key to the pathogenesis of Alzheimer's disease: the role of both raft and non-raft membrane domains. *Curr Alzheimer Res*. 2011;8(2):213-21.
443. de Oliveira FF, Chen ES, Smith MC, Bertolucci PHF. Longitudinal lipid profile variations and clinical change in Alzheimer's disease dementia. *Neuroscience Letters*. 2017;646:36-42.
444. Kaya I, Jennische E, Dunevall J, Lange S, Ewing AG, Malmberg P, et al. Spatial Lipidomics Reveals Region and Long Chain Base Specific Accumulations of Monosialogangliosides in Amyloid Plaques in Familial Alzheimer's Disease Mice (5xFAD) Brain. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11(1):14-24.
445. Hong JH, Kang JW, Kim DK, Baik SH, Kim KH, Shanta SR, et al. Global changes of phospholipids identified by MALDI imaging mass spectrometry in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Lipid Research*. 2016;57(1):36-45.
446. Oblak AL, Lin PB, Kotredes KP, Pandey RS, Garceau D, Williams HM, et al. Comprehensive Evaluation of the 5XFAD Mouse Model for Preclinical Testing Applications: A MODEL-AD Study. *Frontiers in aging neuroscience*. 2021;13:713726.
447. Reilly AM, Tsai AP, Lin PB, Ericsson AC, Oblak AL, Ren H. Metabolic Defects Caused by High-Fat Diet Modify Disease Risk through Inflammatory and Amyloidogenic Pathways in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Nutrients*. 2020;12(10):2977.
448. 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.
449. Yao Y, Shan F, Bian J, Chen F, Wang M, Ren G. D-chiro-inositol-enriched tartary buckwheat bran extract lowers the blood glucose level in KK-Ay mice. *J Agric Food Chem*. 2008;56(21):10027-31.
450. Silva Júnior JAD, Silva A, Figueiredo LS, Araujo TR, Freitas IN, Carneiro EM, et al. D-Pinitol Increases Insulin Secretion and Regulates Hepatic Lipid Metabolism in Msg-Obese Mice. *An Acad Bras Cienc*. 2020;92(4):e20201382.
451. Brandscheid C, Schuck F, Reinhardt S, Schäfer KH, Pietrzik CU, Grimm M, et al. Altered Gut Microbiome Composition and Tryptic Activity of the 5xFAD Alzheimer's Mouse Model. *J Alzheimers Dis*. 2017;56(2):775-88.
452. Rodríguez-Peña MM, Astiarraga B, Seco J, Ceperuelo-Mallafré V, Caballé A, Pérez-Brocal V, et al. Changes in glucagon-like peptide 1 and 2 levels in people with obesity after a diet-induced weight-loss intervention are related to a specific microbiota signature: A prospective cohort study. *Clin Transl Med*. 2021;11(11):e575.
453. Tabrizi R, Ostadmohammadi V, Lankarani KB, Peymani P, Akbari M, Kolahehdooz F, et al. The effects of inositol supplementation on lipid profiles among patients with metabolic diseases: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):123-.
454. Mamo J, Jian L, James A, Flicker L, Esselmann H, Wiltfang J. Plasma lipoprotein β -amyloid in subjects with Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2008;45(4):395-403.
455. Dhaon P, Shah VN. Type 1 diabetes and osteoporosis: A review of literature. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2014;18(2):159.
456. Zebaze RM, Ghasem-Zadeh A, Bohte A, Iuliano-Burns S, Mirams M, Price RI, et al. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *The Lancet*. 2010;375(9727):1729-36.
457. Chen H, Fujita H, Kubo K-y, Onozuka M, Hayashi T, Zhou X. Sophisticated imaging technology in the assessment of osteoporosis risk: Citeseer; 2012.

458. Yang M-W, Wang T-H, Yan P-P, Chu L-W, Yu J, Gao Z-D, et al. Curcumin improves bone microarchitecture and enhances mineral density in APP/PS1 transgenic mice. *Phytomedicine*. 2011;18(2-3):205-13.
459. Wang J, Zhang W, Yu C, Zhang X, Zhang H, Guan Q, et al. Follicle-stimulating hormone increases the risk of postmenopausal osteoporosis by stimulating osteoclast differentiation. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134986.
460. Chin K-Y. The relationship between follicle-stimulating hormone and bone health: Alternative explanation for bone loss beyond oestrogen? *International journal of medical sciences*. 2018;15(12):1373.
461. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(4):292-304.
462. Isoda F, Shiry L, Abergel J, Allan G, Mobbs C. D-chiro-Inositol enhances effects of hypothalamic toxin gold-thiogluconase. *Brain research*. 2003;993(1-2):172-6.
463. Ding H, Wong PT, Lee EL, Gafni A, Steel DG. Determination of the oligomer size of amyloidogenic protein β -amyloid (1–40) by single-molecule spectroscopy. *Biophysical journal*. 2009;97(3):912-21.
464. Hölttä M, Hansson O, Andreasson U, Hertze J, Minthon L, Nägga K, et al. Evaluating amyloid- β oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *PLoS one*. 2013;8(6):e66381.

9. ANEXOS



Review

The Biomedical Uses of Inositols: A Nutraceutical Approach to Metabolic Dysfunction in Aging and Neurodegenerative Diseases



Article

A Negative Energy Balance Is Associated with Metabolic Dysfunctions in the Hypothalamus of a Humanized Preclinical Model of Alzheimer's Disease, the 5XFAD Mouse

Biomedicine & Pharmacotherapy 150 (2022) 112994

Contents lists available at ScienceDirect



Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph



Dietary administration of D-chiro-inositol attenuates sex-specific metabolic imbalances in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease

Primer artículo del compendio

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;8(9). DOI: [10.3390/biomedicines8090295](https://doi.org/10.3390/biomedicines8090295).

Abstract

Inositols are sugar-like compounds that are widely distributed in nature and are a part of membrane molecules, participating as second messengers in several cell-signaling processes. Isolation and characterization of inositol phosphoglycans containing myo- or d-chiro-inositol have been milestones for understanding the physiological regulation of insulin signaling. Other functions of inositols have been derived from the existence of multiple stereoisomers, which may confer antioxidant properties. In the brain, fluctuation of inositols in extracellular and intracellular compartments regulates neuronal and glial activity. Myo-inositol imbalance is observed in psychiatric diseases and its use shows efficacy for treatment of depression, anxiety, and compulsive disorders. Epi- and scyllo-inositol isomers are capable of stabilizing non-toxic forms of β -amyloid proteins, which are characteristic of Alzheimer's disease and cognitive dementia in Down's syndrome, both associated with brain insulin resistance. However, uncertainties of the intrinsic mechanisms of inositols regarding their biology are still unsolved. This work presents a critical review of inositol actions on insulin signaling, oxidative stress, and endothelial dysfunction, and its potential for either preventing or delaying cognitive impairment in aging and neurodegenerative diseases. The biomedical uses of inositols may represent a paradigm in the industrial approach perspective, which has generated growing interest for two decades, accompanied by clinical trials for Alzheimer's disease.

Resumen

Los inositoles son compuestos similares a los azúcares que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y forman parte de las moléculas de membrana, participando como segundos mensajeros en varios procesos de señalización celular. El aislamiento y la caracterización de los fosfoglicanos de inositol que contienen mio o d-chiro-inositol han sido hitos para entender la regulación fisiológica de la señalización de la insulina. Otras funciones de los inositoles se han derivado de la existencia de múltiples estereoisómeros, que pueden conferir propiedades antioxidantes. En el cerebro, la fluctuación de los inositoles en los compartimentos extracelulares e intracelulares regula la actividad neuronal y glial. El desequilibrio del mio-inositol se observa en las enfermedades psiquiátricas y su uso muestra eficacia para el tratamiento de la depresión, la ansiedad y los trastornos compulsivos. Los isómeros de epi- y escilo-inositol son capaces de estabilizar formas no tóxicas de las proteínas β -amiloides, características de la enfermedad de Alzheimer y de la demencia cognitiva en el síndrome de Down, ambas asociadas a la resistencia cerebral a la insulina. Sin embargo, las incertidumbres sobre los mecanismos intrínsecos de los inositoles en relación con su biología siguen sin resolverse. Este trabajo presenta una revisión crítica de las acciones del inositol sobre la señalización de la insulina, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial, y su potencial para prevenir o retrasar el deterioro cognitivo en el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas. Los usos biomédicos de los inositoles pueden representar un paradigma en la perspectiva del enfoque industrial, que ha generado un interés creciente desde hace dos décadas, acompañado de ensayos clínicos para la enfermedad de Alzheimer.

Segundo artículo del compendio

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. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(10):5365. DOI: **10.3390/ijms22105365**.

Abstract

Increasing evidence links metabolic disorders with neurodegenerative processes including Alzheimer's disease (AD). Late AD is associated with amyloid (A β) plaque accumulation, neuroinflammation, and central insulin resistance. Here, a humanized AD model, the 5xFAD mouse model, was used to further explore food intake, energy expenditure, neuroinflammation, and neuroendocrine signaling in the hypothalamus. Experiments were performed on 6-month-old male and female full transgenic (Tg^{5xFAD/5xFAD}), heterozygous (Tg^{5xFAD/-}), and non-transgenic (Non-Tg) littermates. Although histological analysis showed absence of A β plaques in the hypothalamus of 5xFAD mice, this brain region displayed increased protein levels of GFAP and IBA1 in both Tg^{5xFAD/-} and Tg^{5xFAD/5xFAD} mice and increased expression of IL-1 β in Tg^{5xFAD/5xFAD} mice, suggesting neuroinflammation. This condition was accompanied by decreased body weight, food intake, and energy expenditure in both Tg^{5xFAD/-} and Tg^{5xFAD/5xFAD} mice. Negative energy balance was associated with altered circulating levels of insulin, GLP-1, GIP, ghrelin, and resistin; decreased insulin and leptin hypothalamic signaling; dysregulation in main metabolic sensors (phosphorylated IRS1, STAT5, AMPK, mTOR, ERK2); and neuropeptides controlling energy balance (NPY, AgRP, orexin, MCH). These results suggest that glial activation and metabolic dysfunctions in the hypothalamus of a mouse model of AD likely result in negative energy balance, which may contribute to AD pathogenesis development.

Resumen

Cada vez hay más pruebas que relacionan los trastornos metabólicos con los procesos neurodegenerativos, incluida la enfermedad de Alzheimer (EA). La EA tardía se asocia con la acumulación de placas de amiloide (A β), la neuroinflamación y la resistencia central a la insulina. Aquí, se utilizó un modelo de EA humanizado, el modelo de ratón 5xFAD, para explorar más a fondo la ingesta de alimentos, el gasto energético, la neuroinflamación y la señalización neuroendocrina en el hipotálamo. Los experimentos se realizaron en machos y hembras de 6 meses de edad totalmente transgénicos (Tg^{5xFAD/5xFAD}), heterocigotos (Tg^{5xFAD/-}) y no transgénicos (Non-Tg). Aunque el análisis histológico mostró la ausencia de placas A β en el hipotálamo de los ratones 5xFAD, esta región del cerebro mostró un aumento de los niveles de proteína GFAP e IBA1 tanto en los ratones Tg^{5xFAD/-} como en los Tg^{5xFAD/5xFAD} y un aumento de la expresión de IL-1 β en los ratones Tg^{5xFAD/5xFAD}, lo que sugiere una neuroinflamación. Esta situación se acompañó de una disminución del peso corporal, la ingesta de alimentos y el gasto energético tanto en los ratones Tg^{5xFAD/-} como en los Tg^{5xFAD/5xFAD}. El balance energético negativo se asoció a la alteración de los niveles circulantes de insulina, GLP-1, GIP, grelina y resistina; a la disminución de la señalización hipotalámica de la insulina y la leptina; a la desregulación de los principales sensores metabólicos (IRS1 fosforilado, STAT5, AMPK, mTOR, ERK2); y a los neuropéptidos que controlan el balance energético (NPY, AgRP, orexina, MCH). Estos resultados sugieren que la activación glial y las disfunciones metabólicas en el hipotálamo de un modelo de ratón de la EA probablemente resulten en un balance energético negativo, que puede contribuir al desarrollo de la patogénesis de la EA.

Tercer artículo del compendio

López-Gambero AJ, Pacheco-Sánchez B, Rosell-Valle C, Medina-Vera D, Navarro JA, del Mar Fernández-Arjona M, 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. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;150:112994. DOI: [10.1016/j.biopha.2022.112994](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112994).

Abstract

Increasing evidence shows that hypothalamic dysfunction, insulin resistance, and weight loss precede and progress along with the cognitive decline in sporadic Alzheimer's Disease (AD) with sex differences. This study aimed to determine the effect of oral dietary administration of D-Chiro-inositol (DCI), an inositol used against insulin resistance associated with polycystic ovary, on the occurrence of metabolic disorders in the transgenic 5xFAD mouse model of AD (FAD: Family Alzheimer's Disease). DCI was administered from 6 to 10 months of age to male and female 5xFAD mice and control (non-Tg) littermates. Energy balance and multiple metabolic and inflammatory parameters in the hypothalamus, liver and plasma were evaluated to assess the central and peripheral effects of DCI. Results indicated that weight loss and reduced food intake in 5xFAD mice were associated with decreased neuropeptides controlling food intake and the appearance of a pro-inflammatory state in the hypothalamus. Oral administration of DCI partially restored energy balance and hypothalamic parameters, highlighting an increased expression of Npy and Agrp and female-specific downregulation of Gfap and Igf1. DCI also partially normalized impaired insulin signaling and circulating insulin, GLP-1, and GIP deficiencies in 5xFAD mice. Principal component analysis of metabolic parameters indicated the presence of a female-specific fatty liver in 5xFAD mice: DCI administration reversed hepatic fat accumulation, β -oxidation, inflammation and increased GOT and GPT levels. Our study depicts that metabolic impairment along with the cognitive decline in a mouse model of AD, which is exacerbated in females, can be ameliorated by oral supplementation with insulin-sensitizing DCI.

Resumen

Cada vez hay más pruebas de que la disfunción hipotalámica, la resistencia a la insulina y la pérdida de peso preceden y progresan junto con el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer (EA) esporádica con diferencias de sexo. Este estudio tenía como objetivo determinar el efecto de la administración dietética oral de D-Chiro-inositol (DCI), un inositol utilizado contra la resistencia a la insulina asociada al ovario poliquístico, sobre la aparición de trastornos metabólicos en el modelo de ratón transgénico 5xFAD de EA (FAD: Family Alzheimer's Disease). Se administró DCI de 6 a 10 meses de edad a ratones 5xFAD machos y hembras y a compañeros de camada de control (non-Tg). Se evaluó el balance energético y múltiples parámetros metabólicos e inflamatorios en el hipotálamo, el hígado y el plasma para valorar los efectos centrales y periféricos de la DCI. Los resultados indicaron que la pérdida de peso y la reducción de la ingesta de alimentos en los ratones 5xFAD se asociaron con la disminución de los neuropeptidos que controlan la ingesta de alimentos y la aparición de un estado proinflamatorio en el hipotálamo. La administración oral de DCI restableció parcialmente el equilibrio energético y los parámetros hipotalámicos, destacando un aumento de la expresión de Npy y Agrp y una regulación a la baja específica de las hembras de Gfap e Igf1. El DCI también normalizó parcialmente la señalización de la insulina y las deficiencias de insulina, GLP-1 y GIP circulantes

en los ratones 5xFAD. El análisis de componentes principales de los parámetros metabólicos indicó la presencia de un hígado graso específico de las hembras en los ratones 5xFAD: La administración de DCI revirtió la acumulación de grasa hepática, la β -oxidación, la inflamación y el aumento de los niveles de GOT y GPT. Nuestro estudio muestra que el deterioro metabólico, junto con el deterioro cognitivo en un modelo de ratón de la EA, que se agrava en las hembras, puede ser mejorado por la suplementación oral con DCI sensibilizador de la insulina.