



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

La enfermedad de Alzheimer como patología metabólica cerebral. Rol de la glía en la regulación de la homeostasis energética cerebral.

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Química Biológica

Licenciada Melisa Inés María Bentivegna

Director de tesis: Dr. Juan Beauquis

Director Adjunto: Dr. Carlos Javier Pomilio

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Tomás Cánepa

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) y
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
(FCEyN), Universidad de Buenos Aires (UBA).

Buenos Aires, 2025

Agradecimientos

Tengo la suerte de que durante estos años de Tesis muchas personas me han guiado, apoyado y acompañado. A todos ellos y ellas quiero agradecerles profundamente.

A Juan, mi director de la tesina de licenciatura y a quien volví a elegir para que me dirigiera en el Doctorado. Sinceramente, no podría haber tenido un mejor director: siempre disponible para responder mis consultas, enseñarme con paciencia y comprensión, y acompañarme en cada etapa con un apoyo constante, tanto académico como personal. Estuvo presente siempre que lo necesité, y lo valoro un montón.

A nuestra jefa, Flavia, quien es siempre capaz de encontrar el lado positivo incluso en los momentos más difíciles. Y una gran persona, atenta tanto a nuestro bienestar laboral como personal. En un contexto tan complejo como el que estamos atravesando, contar con una jefa así es imprescindible.

A mi codirector, Charly. Además de ser un excelente guía, fue también un gran amigo a lo largo de todos estos años. Su entusiasmo por la ciencia y la docencia se refleja en su forma de dirigir, siempre con buena onda y cercanía. Estuvo presente en momentos clave, ayudándome a destrabarme cuando más lo necesitaba.

A Angie, mi codirectora de tesina y guía durante los primeros años del doctorado. Siempre generosa con su tiempo y conocimientos, dejó una huella importante en nuestro Laboratorio.

A mis compañeros y amigos Amal, Jessi, Nico, Meli, Sole, Lucho, y a los nuevos integrantes del grupo: Vale, Facu y Tincho. Compartir el día a día con ellos, entre risas, mates y trabajo en equipo, hizo que este camino fuera mucho más llevadero y disfrutable. El compañerismo que construimos hace que realmente dé gusto trabajar con ellos.

A nuestras primas de QB, Dai, Vane y Fati. Por su alegría contagiosa y ganas de pensar nuevos proyectos colaborando juntas.

A las chicas de nuestro labo hermano del IByME, Sole, Euge, Ali y Moni, por esos años compartiendo laboratorio, por toda su ayuda y colaboración.

Agradecimientos

A Pablo y Sebas del microscopio, que me han enseñado con mucha dedicación y acompañado durante largas horas sacando fotos en el confocal.

A mi Comité de Seguimiento de Tesis: Flor, Ezequiel y Edu, que se han tomado el tiempo de reunirse conmigo en más de una oportunidad y me han sabido aconsejar y guiar en los momentos en que todavía no tenía el camino a seguir tan claro.

A mis amigos de la vida: Andi, Maru, Juli, Marti, Sofi, Mauro, Caro, Lu, Flor, Ani, Lore, Billy, Mati D., Charly, Levi, Fefo, Petu y Mati M. Por tantos años de amistad compartida, y por estar siempre, en las buenas y en las malas.

A mis amigas de Acatushun: Anto, Fer, Sari, Yes y Coti. Que conocí hace muchos años como voluntarias del museo y con quienes comparto el amor por la biología y la docencia.

Mis amigos y vecis de Rauch: Pierre, Jose, Santi, Facu, Sol, Diani, Agus, Nadi y Sofi. Me mudé al edificio en un momento muy complicado, y hacerme amiga de ellos me hizo sentir en familia desde el principio.

A los profes del Scholem, por su apoyo constante, su comprensión y su paciencia cada vez que lo necesité. Y a mis alumnitos, que quiero mucho y con quienes me encanta compartir la ciencia.

A Tamara, mi psicóloga, que me supo guiar en momentos muy difíciles y se esforzó porque mantuviera el enfoque y siguiera adelante con mi Tesis.

A Sabri, mi profesora de canto, por su infinita paciencia frente a mis excusas (la tesis, siempre la tesis) y por abrirme las puertas del canto lírico.

Al Coro de Jóvenes Lagun Onak, que, aunque los conozco hace solo algunos meses, me recibió con los brazos abiertos en su hermoso grupo. Compartir el canto con ellos me llena de alegría.

A Robincita, mi roomie, que estuvo acompañándome con tanto cariño durante los últimos años y sobre todo durante el proceso de escritura de la Tesis hasta altas horas de la madrugada.

A mi mamá y mi papá, por transmitirme con amor la vocación por el conocimiento y la docencia, sin quienes no podría haber llegado hasta acá.

A mis hermanas, las personas que más quiero en el mundo, siempre cuidándome y bancándome en todas mis locuras.

Agradecimientos

Y finalmente, a la ciencia y a la educación pública argentinas, que me llenan de orgullo y a las que debo toda mi formación, les dedico esta Tesis.

Índice

Resumen	9
La enfermedad de Alzheimer como patología metabólica cerebral. Rol de la glía en la regulación de la homeostasis energética cerebral.....	9
Palabras clave:	10
Abstract	11
Alzheimer's disease as a cerebral metabolic disorder: The role of glia in regulating brain energy homeostasis.	11
Keywords:.....	11
Publicaciones	12
Abreviaturas	14
Introducción	16
La enfermedad de Alzheimer	17
Historia	17
Definición, prevalencia e impacto socioeconómico de la EA	18
Clasificación de la EA y factores de riesgo	20
Hipótesis etiopatogénicas y terapias	24
Vías amiloidogénica y no amiloidogénica en la fisiopatología del Alzheimer	27
Modelos animales de la EA.....	29
Alteraciones metabólicas cerebrales	30
EA y el envejecimiento fisiológico	30
EA y diabetes mellitus tipo 2.....	32

Acción de la insulina en el cerebro	37
Acción de la insulina en los astrocitos	40
Resistencia a insulina en el cerebro.....	41
Relevancia de los astrocitos en el metabolismo energético cerebral	44
Importancia de los astrocitos en la unidad neurovascular	47
Reserva energética astrocitaria: glucógeno y <i>shuttle</i> de lactato	49
Implicaciones funcionales y patológicas de la relevancia astrocitaria.....	51
Objetivos e hipótesis	55
Objetivo general	56
Objetivo 1: Caracterización de los cambios metabólicos en ratones transgénicos PDAPP-J20, modelo de la EA	56
Objetivo 2: Análisis del perfil de activación y cambios en vías metabólicas en modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de la EA	57
Objetivo 3: Modulación funcional y mecanística de la insulina en el metabolismo energético de astrocitos expuestos a A β	58
Resultados	59
Resultados <i>in vivo</i>	60
Perfil conductual	62
Perfil metabólico	67
Inflamación pancreática	74
Señalización sistémica y central de la insulina	76
Reactividad astrogliar en el hipocampo.....	80
Resultados <i>in vitro</i>	83
Resultados en la línea de astrocitoma de rata C6	83
Resultados en cultivos primarios de astrocitos	87
Discusión	118

Cambios metabólicos en el modelo transgénico PDAPP-J20	119
Perfil conductual y reactividad glial hipocampal en el modelo transgénico PDAPP-J20	120
Implicancias de la resistencia a la insulina cerebral en la enfermedad de Alzheimer.....	122
Estrategias terapéuticas para mejorar la sensibilidad insulínica cerebral en la enfermedad de Alzheimer	124
Cambios inducidos por β -amiloide en astrocitos: señalización insulínica, metabolismo energético y disfunción mitocondrial	125
Metabolismo glucídico astrogial en AD.....	130
Efectos de la insulina en el metabolismo glucídico de los astrocitos	131
Captación de glucosa y manejo del glucógeno en astrocitos	131
Acción de la insulina sobre el metabolismo energético astrogial	134
Gotas lipídicas y metabolismo energético astrogial.....	134
Conclusiones	136
Materiales y Métodos	139
Materiales y métodos <i>in vivo</i>	140
Animales y grupos experimentales	140
Evaluaciones comportamentales	143
Medición de peso corporal, glucemia y procedimiento de eutanasia	144
Cuantificación de insulina sérica por radioinmunoensayo y prueba HOMA-IR	145
Procesamiento del tejido	146
Western Blot de tejido	146
Cuantificación de inmunofluorescencias en tejido.....	147
Materiales y métodos <i>in vitro</i>	149
Cultivos celulares	149
Preparación de β -amiloide ₁₋₄₂ fibrilar.....	150
Preparación de palmitato	150

Tratamiento con insulina <i>in vitro</i>	151
Extracción de proteínas y Western Blot en cultivos celulares de astrocitos – Línea C6.....	151
Extracción de proteínas y Western Blot en cultivos celulares de astrocitos – astrocitos primarios	152
Inmunofluorescencia en astrocitos de cultivo primario	153
Tinción con sondas fluorescentes	155
Medición de captación de glucosa con 2-NBDG.....	159
Liberación de lactato en cultivo primario	160
Detección de glucógeno (tinción de PAS).....	161
Ensayo de incorporación de A β	162
Estadística	162
Bibliografía	164

Resumen

La enfermedad de Alzheimer como patología metabólica cerebral. Rol de la glía en la regulación de la homeostasis energética cerebral.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el trastorno neurodegenerativo más prevalente, caracterizado por la presencia de placas de β -amiloide ($A\beta$), neuroinflamación y deterioro cognitivo. Las alteraciones metabólicas, en particular la resistencia a la insulina cerebral, son cada vez más reconocidas como características centrales de la fisiopatología de la EA. Los astrocitos, esenciales para el metabolismo energético cerebral, presentan una pérdida de funciones homeostáticas en la EA, lo que podría favorecer la neurodegeneración. Aunque los principales transportadores de glucosa astrocitarios no dependen de la insulina, esta hormona podría regular el metabolismo glucídico de la glía.

Nuestro objetivo fue evaluar la señalización de insulina y el metabolismo de los astrocitos en el modelo transgénico PDAPP-J20 de EA familiar y en cultivos primarios de astrocitos de ratón expuestos a $A\beta$. Los ratones adultos PDAPP-J20 mostraron hiperinsulinemia, resistencia a la insulina en el hipocampo y activación proinflamatoria de los astrocitos. Se observaron diferencias dependientes del sexo en la señalización de insulina en el hipocampo, con una reducción en la fosforilación de Akt en los machos. Este fenotipo glial reactivo estuvo acompañado por una disminución en los niveles del receptor de insulina en este contexto crónico.

La exposición de astrocitos primarios a $A\beta$ indujo activación proinflamatoria, estrés oxidativo y pérdida del transportador de glutamato EAAT2, clave para la neuroprotección. Aunque los astrocitos expuestos a $A\beta$ mostraron un aumento en los niveles del receptor de insulina en este contexto agudo, la fosforilación inducida por insulina del receptor se vio reducida. Además, los astrocitos tratados con $A\beta$ presentaron un aumento en la captación de glucosa, la liberación de lactato y el almacenamiento de glucógeno. El tratamiento con insulina se asoció con una recuperación del potencial de membrana mitocondrial y un incremento en la captación de $A\beta$, lo que destaca un rol pro-homeostático de la hormona.

Nuestros resultados subrayan la interacción entre la señalización de insulina y el metabolismo astrocitario en diferentes contextos experimentales y temporales de la patología amiloide.

Resumen

Comprender estos mecanismos podría contribuir al diseño de estrategias terapéuticas orientadas a restaurar el equilibrio metabólico y mitigar la neurodegeneración.

Palabras clave:

Enfermedad de Alzheimer | amiloide | astrocitos | resistencia a la insulina | glucosa | metabolismo energético cerebral | neuroinflamación | disfunción mitocondrial

Abstract

Alzheimer's disease as a cerebral metabolic disorder: The role of glia in regulating brain energy homeostasis.

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disorder, characterized by amyloid beta (A β) plaques, neuroinflammation and cognitive impairment. Metabolic disturbances, particularly brain insulin resistance, are increasingly recognized as central features of AD pathophysiology. Astrocytes, essential for brain energy metabolism, exhibit a loss of homeostatic functions in AD, possibly promoting neurodegeneration. Even though the main astrocytic glucose transporters are non-insulin dependent, insulin may regulate astroglial glucose metabolism. Our objective was to evaluate insulin signaling and astrocyte metabolism in the PDAPP-J20 transgenic mouse model of familial AD and in mouse primary astrocyte cultures exposed to A β . Adult PDAPPJ20 mice showed hyperinsulinemia, hippocampal insulin resistance and astrocytic proinflammatory activation. Sex-dependent differences were found in hippocampal insulin signaling, with reduced Akt phosphorylation in male mice. The reactive glial phenotype was accompanied by a decreased insulin receptor levels in this chronic setting. Exposure of primary astrocytes to A β induced proinflammatory activation, oxidative stress and loss of glutamate transporter EAAT2, crucial for neuroprotection. Even though A β -exposed astrocytes showed increased insulin receptor levels in this acute setting, insulin-induced phosphorylation of the receptor was hampered. Amyloid-treated astrocytes also showed increased glucose uptake, lactate release and glycogen storage. Insulin treatment was associated with a recovery of mitochondrial membrane potential and increased amyloid uptake, highlighting a pro-homeostatic role for the hormone. Our results highlight the interplay between insulin signaling and astrocyte metabolism at different experimental and temporal settings of amyloid pathology. Understanding these mechanisms may help to design therapeutic strategies aimed at restoring metabolic balance and mitigating neurodegeneration.

Keywords:

Alzheimer's disease | amyloid | astrocytes | insulin resistance | glucose | brain energy metabolism | neuroinflammation | mitochondrial dysfunction

Publicaciones

Gran parte de los resultados expuestos en esta Tesis -así como hallazgos adicionales generados en el marco de mi doctorado pero que exceden sus objetivos- se han difundido en las siguientes publicaciones:

Bentivegna M, Pomilio C, Bellotto M, González Pérez NG, Rossi S, Gregosa A, Vota D, Merech F, Bonaventura MM, Presa J, Vinuesa A, Lux-Lantos V, Porte Alcón S, Saravia F, Beauquis J. Amyloid beta regulates astrocytic glucose metabolism and insulin signaling in experimental models of Alzheimer's disease. **Aging and disease, 2025 (en revisión).**

González Pérez NG, Bellotto M, Bentivegna M, Arcucci L, Vinuesa A, Presa J, Brites F, Vissio P, Pérez Sirkin D, Beauquis J, Saravia F, Pomilio C. Metformin rescues microglial homeostasis and protects against type 2 diabetes mellitus-related dementia risk. **Life Sciences, 2025.** DOI: [10.1016/j.lfs.2025.123803](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2025.123803)

Pomilio C, Presa J, Osés C, Vinuesa A, Bentivegna M, Gregosa A, Riudavets M, Sevlever G, Galván V, Levi V, Beauquis J, Saravia F. Loss of Direct Vascular Contact to Astrocytes in the Hippocampus as an Initial Event in Alzheimer's Disease. Evidence from Patients, In Vivo and In Vitro Experimental Models. **Molecular Neurobiology, 2024.** DOI: [10.1007/s12035-023-03897-5](https://doi.org/10.1007/s12035-023-03897-5)

Vinuesa A, Pomilio C, Gregosa A, Bentivegna M, Presa J, Bellotto M, Saravia F, Beauquis J. Inflammation and Insulin Resistance as Risk Factors and Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience, 2021.** DOI: [10.3389/fnins.2021.653651](https://doi.org/10.3389/fnins.2021.653651)

Pomilio C, Gorojod RM, Riudavets M, Vinuesa A, Presa J, Gregosa A, Bentivegna M, Alaimo A, Porte Alcon S, Sevlever G, Kotler ML, Beauquis J, Saravia F. Microglial autophagy is impaired by prolonged

exposure to β -amyloid peptides: evidence from experimental models and Alzheimer's disease patients. **Geroscience**, 2020. DOI: [10.1007/s11357-020-00161-9](https://doi.org/10.1007/s11357-020-00161-9)

Gregosa A, Vinuesa A, Todero MF, Rossi S, Pomilio C, Wenker S, Bentivegna M, Presa J, Saravia F, Beauquis J. Periodic dietary restriction ameliorates amyloid pathology and cognitive impairment in PDAPP-J20 mice: Potential implication of glial autophagy. **Neurobiology of Disease**, 2019. DOI: [10.1016/j.nbd.2019.104542](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104542)

Vinuesa A, Bentivegna M, Calfa G, Filipello F, Pomilio C, Bonaventura MM, Lux-Lantos V, Matzkin ME, Gregosa A, Presa J, Matteoli M, Beauquis J, Saravia F. Early Exposure to a High-Fat Diet Impacts on Hippocampal Plasticity: Implication of Microglia-Derived Exosome-like Extracellular Vesicles. **Molecular Neurobiology**, 2019. DOI: [10.1007/s12035-018-1435-8](https://doi.org/10.1007/s12035-018-1435-8)

Abreviaturas

A1 (astroglia A1) – Subtipo neurotóxico de astrocitos reactivos inducido por inflamación

AGs – Ácidos grasos

APP – Amyloid Precursor Protein (Proteína precursora de amiloide)

A β – β -amiloide

A β_{1-40} / A β_{1-42} – Isoformas del péptido β -amiloide de 40 o 42 aminoácidos

BACE1 – Beta-site APP Cleaving Enzyme 1

BHE – Barrera Hematoencefálica

CA1 – Región específica del hipocampo (Cornu Ammonis 1)

CD – Control Diet (Dieta control)

CTL – Control (condición experimental)

DAB – 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (inhibidor de glucógeno fosforilasa)

DCL – Deterioro Cognitivo Leve

DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

DO – Densidad óptica

EA – Enfermedad de Alzheimer

EAAT2 – Excitatory Amino Acid Transporter 2 (también llamado GLT-1)

GCU – Green Calibrated Units (unidades calibradas en verde del sistema Incucyte)

GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein (proteína fibrilar ácida de los astrocitos)

GLT-1 – Glutamate Transporter 1 (transportador de glutamato 1; también llamado EAAT2)

Abreviaturas

GLUT1 / GLUT3 – Glucose Transporter 1 / 3 (transportador de glucosa 1/3)

IDE – Insulin-Degrading Enzyme (Enzima Degradadora de Insulina)

IGF 1 – Insulin-like Growth Factor 1 (Factor de crecimiento similar a la insulina 1)

IGF1R – Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (Receptor de IGF-1)

IR – Insulin Receptor (Receptor de Insulina)

IRS / IRS-1 – Insulin Receptor Substrate 1 (Sustrato 1 del receptor de insulina)

LD – Lipid Droplets (Gotas lipídicas)

MitoSOX – Sonda fluorescente para superóxido mitocondrial

MitoSpy – Sonda fluorescente para morfología mitocondrial

NTg – No transgénico

OF – Open Field (campo abierto)

PDAPP-J20 – Modelo transgénico murino de Alzheimer

PFA – Paraformaldehído

PSEN1 / PSEN2 – Presenilina 1 / 2

RFU – Relative Fluorescence Units (unidades de fluorescencia relativa)

SFB – Suero fetal bovino

Tg – Transgénico

UNV – Unidad Neurovascular

mTORC2 – mechanistic Target of Rapamycin Complex 2 (Complejo 2 del objetivo mecanístico de la rapamicina)

sAPP α – APP soluble alfa

Introducción

La enfermedad de Alzheimer

Historia

En 1901, el psiquiatra alemán Alois Alzheimer trató como paciente a Auguste Deter, una mujer de 51 años, quien durante el año anterior había experimentado un marcado deterioro cognitivo, evidenciado por su incapacidad de realizar tareas cotidianas, paranoia, miedo hacia personas conocidas, e incapacidad de formar recuerdos (Goedert & Ghetti, 2007).

En 1906, tras la muerte de la paciente, Alzheimer solicitó que le enviaran su cerebro para su análisis. Los hallazgos fueron publicados al año siguiente, en un breve artículo donde realizó una descripción histopatológica de la enfermedad de Auguste. Alzheimer observó abundantes placas y ovillos neurofibrilares en la corteza cerebral mediante un método de tinción con plata reducida.

En un cerebro normal, este método de tinción permite visualizar “neurofibrillas” (descriptas a fines del siglo XIX) (Bethe, 1899), una red de filamentos finos que atraviesan la neurona y corresponden al citoesqueleto neuronal.

En la corteza cerebral de la paciente, Alzheimer observó que la tinción con plata estaba aumentada en muchas neuronas, lo que atribuyó a un engrosamiento anormal de las neurofibrillas en forma de “ovillos”. Estos ovillos sobrevivían a la muerte de las neuronas, permaneciendo como ovillos extracelulares (Fig. 1).

Las placas fueron descritas por primera vez en 1892 por Paul Blocq y Georges Marinesco, en el cerebro de un anciano epiléptico. Emil Redlich las describió en 1898 en dos casos de demencia senil. Más tarde, Oskar Fischer estudió placas neuríticas en demencia senil y su ausencia en otros trastornos, concluyendo que eran una característica específica de esta condición. Por esto, se las llamó durante un tiempo placas de Redlich o de Fischer (Goedert & Ghetti, 2007).



Figura 1. Los depósitos anormales que describió Alzheimer. Ovillos neurofibrilares (marrón) y placas neuríticas (azul oscuro) en la enfermedad de Alzheimer. Los ovillos fueron teñidos con un anticuerpo contra la proteína tau y las placas con un anticuerpo contra β -amiloide (Goedert & Ghetti, 2007).

Definición, prevalencia e impacto socioeconómico de la EA

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa compleja, de curso progresivo, que involucra síntomas cognitivos, conductuales y funcionales. Con el tiempo, compromete gravemente la autonomía del paciente, hasta culminar en su fallecimiento. Los síntomas incluyen deterioro de la memoria, trastornos del lenguaje, alteraciones conductuales y psicológicas, así como un progresivo deterioro funcional.

Actualmente no existe cura, aunque sí existen tratamientos farmacológicos y no farmacológicos (como la estimulación y rehabilitación cognitiva) que buscan restaurar el funcionamiento neuronal y prevenir la pérdida sináptica y la muerte celular. Desde el diagnóstico hasta el fallecimiento pueden transcurrir entre 10 y 20 años, con una supervivencia media estimada en 10 años, dependiendo de factores patológicos concomitantes y del tipo de cuidados recibidos (“2023 Alzheimer’s Disease Facts and Figures,” 2023).

El tratamiento requiere un abordaje multidisciplinario, que incluye consultas frecuentes en consultorios externos, el uso de tecnología médica para el diagnóstico y tratamiento, esquemas farmacológicos, evaluaciones neuropsicológicas, actividades de estimulación cognitiva,

rehabilitación, internaciones frecuentes ante el deterioro de la salud general, e incluso la institucionalización del paciente.

La evolución clínica y el pronóstico generan altos costos para los sistemas de salud, tanto en infraestructura como en recursos humanos especializados. A esto se suma el fuerte impacto socioeconómico en el entorno más cercano del paciente: su familia. En muchos casos, los familiares asumen no solo los costos económicos, sino también cargas psicológicas y físicas. Ubicada como la tercera enfermedad con mayores costos sociales en salud, después de la cardiopatía isquémica y el cáncer, la EA se ha convertido en una afección cada vez más frecuente a escala global (Wimo et al., 2013).

En 2010, los costos asociados al cuidado de personas con EA ascendieron a 604 mil millones de dólares anuales a nivel mundial, lo cual representa más del 1 % del producto bruto interno global. Se estima, por ejemplo, que por cada enfermo dos familiares se ven afectados psicológicamente, y que el 40 % de ellos debe dejar de trabajar (*Estado de la Situación de Demencias, Programa Nacional de Datos. Docencia e Investigación en Alzheimer y otros Trastornos Cognitivos FMED UBA*). Este impacto transforma a la enfermedad de Alzheimer en una patología que afecta no solo al paciente, sino también a su entorno más directo.

Las tendencias mundiales actuales, como la disminución de la tasa de natalidad, el aumento en la esperanza de vida al nacer y los cambios en los patrones de enfermedad, invalidez y mortalidad, han modificado los perfiles demográficos y plantean nuevos desafíos para la salud pública. Más de 100 años después de haberse identificado la patología, la EA representa un desafío creciente, afectando actualmente entre 40 y 50 millones de personas en todo el mundo (Wu et al., 2022).

Se estima que para el año 2050 esta cifra alcanzará los 100 millones (Matthews et al., 2016). En Argentina, se estima que la prevalencia de demencia en personas mayores de 65 años es del 12,2 %, y que aproximadamente el 60 % de esos casos corresponden a EA. Esto implica que cerca de 360.000 personas padecen Alzheimer en el país (*Estado de la Situación de Demencias, Programa Nacional de Datos. Docencia e Investigación en Alzheimer y otros Trastornos Cognitivos FMED UBA*).

Este panorama representa un desafío creciente para el sistema de salud argentino, especialmente considerando el envejecimiento de la población y la necesidad de implementar estrategias efectivas para la prevención, el diagnóstico temprano y el cuidado integral de las personas afectadas.

Clasificación de la EA y factores de riesgo

La EA se clasifica en dos variantes principales según su origen genético y momento de aparición: una forma familiar de inicio temprano (*early-onset Alzheimer's disease*, EOAD) y una forma esporádica de inicio tardío (*late-onset Alzheimer's disease*, LOAD) (Piaceri, 2013). La EA de aparición tardía es la forma más prevalente, con inicio posterior a los 65 años, y representa aproximadamente el 95% de los casos. En cambio, la EA de inicio temprano, que se manifiesta entre los 30 y los 65 años, constituye el 5% del total (Fig. 2).

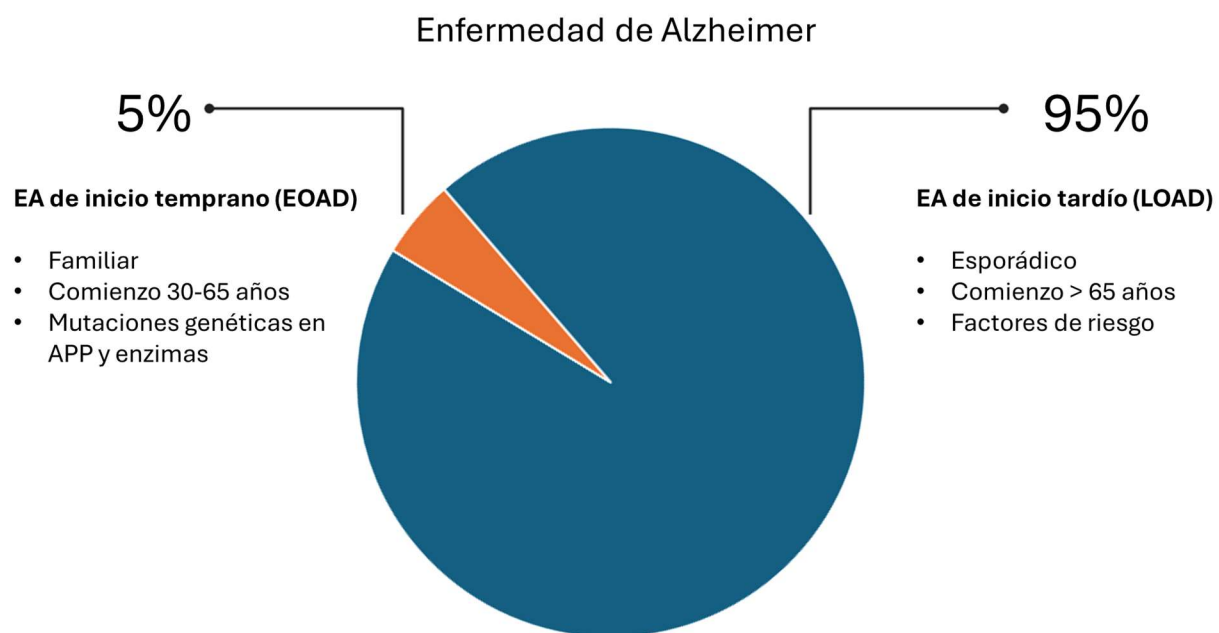


Figura 2. Distribución de los casos de enfermedad de Alzheimer según su origen. Aproximadamente el 95% de los casos corresponde a formas esporádicas, mientras que solo un 5% son de origen familiar, asociadas a mutaciones autosómicas dominantes en genes como *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*.

EA familiar

La variante menos frecuente de la EA corresponde a las formas familiares (FAD) que se caracterizan por presentar herencia autosómica dominante y múltiples individuos afectados en distintas generaciones. Aunque clínicamente son indistinguibles de los casos esporádicos, la FAD está asociada a mutaciones altamente penetrantes en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* (Bekris et al., 2010). Estas mutaciones suelen inducir un aumento en la producción del péptido β -amiloide 1-42

Introducción

(A β_{1-42}), la forma más neurotóxica y agregante del péptido, cuya toxicidad puede manifestarse incluso antes de formar depósitos fibrilares (Varvel et al., 2008).

El primer gen vinculado a la EA fue APP, localizado en el cromosoma 21, cuyo procesamiento proteolítico origina el A β . APP codifica una glicoproteína transmembrana cuya isoforma predominante en el sistema nervioso central es APP695. Su procesamiento por la vía amiloidogénica, a través de las enzimas β - y γ -secretasa, genera el fragmento A β_{1-42} ; en contraste, la vía no amiloidogénica, que involucra a la α -secretasa, produce principalmente A β_{1-40} , menos propenso a la agregación (Tabaton & Tamagno, 2007; Tanzi & Bertram, 2005). Hasta el momento se han identificado más de 30 mutaciones en APP, principalmente en los exones 16 y 17, la mayoría de las cuales aumentan la proporción de A β_{1-42} (Theuns et al., 2006). Estas mutaciones presentan penetrancia completa, aunque se ha descrito también una variante recesiva con efecto dominante negativo sobre la amiloidogénesis (Di Fede et al., 2009).

Los genes PSEN1 y PSEN2, que codifican subunidades del complejo γ -secretasa, están involucrados en la mayoría de los casos de FAD. En particular, las mutaciones en PSEN1 (cromosoma 14) son la causa genética más frecuente de EA familiar de inicio temprano (EOFAD). Se asocian con formas severas de la enfermedad, de progresión rápida y edad media de aparición en torno a los 45 años, aunque algunas variantes pueden generar síntomas antes de los 30 años y cursar con fenotipos atípicos como convulsiones o alteraciones del lenguaje (Kovacs & Tanzi, 1998; Larner & Doran, 2006; Menéndez, 2004; Miklossy et al., 2003).

Por su parte, PSEN2, ubicado en el cromosoma 1, es una causa mucho más infrecuente de FAD. La primera mutación fue descrita en familias de ascendencia alemana del Volga (Rogaev et al., 1995), y en total se han identificado unas veinte variantes. A diferencia de PSEN1, PSEN2 muestra una gran heterogeneidad clínica, con edades de inicio que pueden oscilar entre los 39 y los 85 años incluso dentro de la misma familia, lo que sugiere una fuerte influencia de factores modificadores genéticos y ambientales (Jayadev et al., 2010).

EA esporádica

La enfermedad de Alzheimer (EA) esporádica representa aproximadamente el 95% de todos los casos. Aunque el alelo $\epsilon 4$ del gen APOE ha sido identificado como el principal factor de riesgo genético, más del 60% de los casos esporádicos no lo presentan, lo que sugiere la existencia de

múltiples determinantes genéticos y ambientales en la etiología de la enfermedad (Bertram et al., 2010). APOE codifica una lipoproteína clave en el transporte de colesterol en el sistema nervioso central; su variante $\epsilon 4$ incrementa significativamente el riesgo de desarrollar EA, mientras que $\epsilon 2$ ejerce un efecto protector. Esta asociación podría explicarse por la capacidad del alelo $\epsilon 4$ para promover la agregación de A β y su presencia en placas seniles y ovillos neurofibrilares (Castano et al., 1995), así como por sus efectos sobre la señalización neuronal y el metabolismo lipídico, que podrían contribuir al hipometabolismo cerebral y la disfunción sináptica observados incluso en individuos portadores asintomáticos (Drzezga et al., 2005; Martins et al., 2006). Recientes estudios de gran escala han propuesto que el riesgo conferido por APOE podría ser comparable al de genes causales en enfermedades mendelianas (Genin et al., 2011).

Además, los estudios de asociación genómica amplia (GWAS) han permitido identificar numerosos genes de susceptibilidad adicionales, mejorando la comprensión de las bases genéticas de la EA esporádica (Ertekin-Taner, 2010). Aunque cada uno de estos loci confiere un riesgo modesto, su efecto combinado es significativo. Entre los genes más destacados se encuentran CLU, PICALM, CR1, BIN1, ABCA7, CD33, EPHA1 y CD2AP, los cuales están implicados en funciones celulares clave como la eliminación de A β , la neuroinflamación, el tráfico vesicular, el metabolismo lipídico y la función sináptica (Morgan, 2011). Estos hallazgos refuerzan la idea de que, además de la vía amiloide clásica, una red compleja de procesos celulares y moleculares contribuye a la patogénesis de la EA.

Un informe de la Comisión Lancet publicado en 2020 identifica 14 factores de riesgo modificables que podrían estar implicados en hasta un 45 % de los casos de demencia, lo que sugiere un amplio margen para la prevención a lo largo del curso de vida (Livingston et al., 2020).

Las estrategias recomendadas incluyen mejorar la educación y estimulación cognitiva temprana, promover la actividad física regular, optimizar el manejo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares, fomentar una nutrición saludable, y tratar adecuadamente problemas de audición y salud mental. Además, los autores enfatizan la importancia de conexión social y control de la contaminación ambiental como elementos críticos de salud cerebral (Fig. 3).

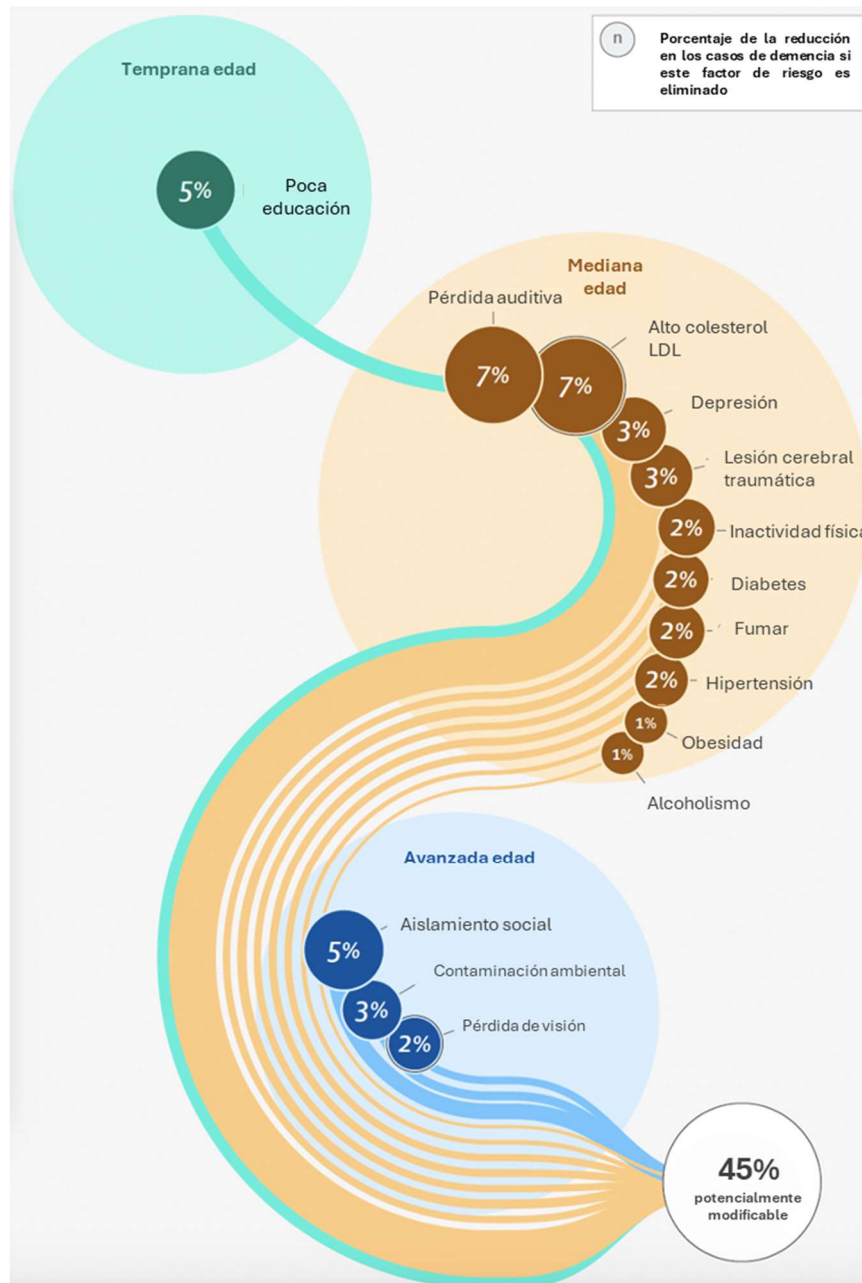


Figura 3. Fracción atribuible poblacional de factores de riesgo potencialmente modificables para la demencia (Imagen basada en Livingston et al., 2020).

Sin embargo, es importante subrayar que la edad avanzada sigue siendo el principal factor de riesgo no modificable para la EA y otras demencias. El envejecimiento promueve muchos de los mecanismos etiopatogénicos que serán desarrollados en la siguiente subsección, como la disfunción metabólica, la neuroinflamación y el estrés oxidativo cerebral. Estos procesos,

característicos del envejecimiento cerebral, establecen un terreno propicio para la aparición de neurodegeneración.

A su vez, muchos de los factores de riesgo modificables señalados por los autores -como la diabetes tipo 2, la obesidad, la hipercolesterolemia, el tabaquismo, el alcoholismo, la hipertensión y los traumatismos craneoencefálicos- impactan directamente sobre estos mismos mecanismos fisiopatológicos, acelerando el deterioro neuronal y exacerbando la vulnerabilidad del cerebro envejecido.

Estas medidas no solo buscan reducir la exposición a factores de riesgo, sino también mitigar procesos biológicos que subyacen a la fisiopatología de la EA, reforzando así la relevancia del enfoque adoptado en esta tesis para el estudio de dichos mecanismos.

Hipótesis etiopatogénicas y terapias

Hipótesis centradas en la disfunción de neurotransmisores

Entre las teorías etiopatogénicas propuestas para la EA, un grupo relevante se centra en la disfunción de sistemas de neurotransmisión, fundamentales para el procesamiento cognitivo. La hipótesis colinérgica, una de las más antiguas y mejor caracterizadas, propone que la pérdida de neuronas colinérgicas y la consiguiente deficiencia de acetilcolina (ACh) en el hipocampo y la corteza contribuyen significativamente al deterioro cognitivo observado en la EA (Pepeu & Giovannini, 2004; Ruberg et al., 1985). Esta teoría ha dado lugar a la principal clase de tratamientos disponibles actualmente, los inhibidores de la acetilcolinesterasa (como donepezilo, galantamina y huperzina A), que aumentan la disponibilidad sináptica de ACh y producen mejoras sintomáticas temporales (Blennow et al., 2006).

Por otro lado, se ha propuesto una hipótesis glutamatérgica, que considera la participación de un exceso de activación de los receptores NMDA de glutamato, lo cual induce excitotoxicidad neuronal y pérdida sináptica. En este marco se sitúa el uso clínico de memantina, un antagonista no competitivo de estos receptores, aprobado para el tratamiento de estadios moderados a severos de la enfermedad (Reisberg et al., 2003). Esta estrategia busca modular la señalización glutamatérgica patológica sin interferir con la transmisión fisiológica, mitigando así el daño neuronal asociado al exceso de calcio intracelular.

Introducción

Estas hipótesis, centradas en la neurotransmisión, ofrecen una perspectiva complementaria a otras teorías etiopatogénicas, al enfocarse en los mecanismos funcionales sinápticos y no exclusivamente en la acumulación proteica o en la disfunción metabólica.

Hipótesis proteinopáticas: β -amiloide y tau

La EA se enmarca en el grupo de las proteinopatías, es decir, enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la acumulación patológica de proteínas mal plegadas en el sistema nervioso central. En este contexto, las dos proteínas centrales implicadas en la EA son el péptido A β y la proteína tau hiperfosforilada.

La hipótesis amiloide, dominante en el campo de la investigación terapéutica, propone que la acumulación anormal de A β en forma de placas seniles extracelulares constituye el evento inicial en la cascada patogénica de la EA (Hardy & Allsop, 1991). Esta proteína, derivada del procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide (APP), puede agregarse en formas tóxicas que inducen disfunción sináptica, inflamación, estrés oxidativo y pérdida neuronal progresiva. Esta teoría se apoya tanto en observaciones clínicas como en evidencia genética, incluyendo mutaciones en APP, PSEN1 y PSEN2, asociadas a formas familiares de EA de inicio temprano (Karran & De Strooper, 2016).

Paralelamente, la hipótesis tau plantea que la hiperfosforilación de la proteína tau -un estabilizador de microtúbulos en las neuronas- conduce a su agregación en ovillos neurofibrilares intracelulares. Estas estructuras alteran profundamente la arquitectura del citoesqueleto neuronal, comprometiendo el transporte axonal y desencadenando procesos degenerativos. Aunque inicialmente se consideró un evento tardío, múltiples estudios sugieren que la disfunción de tau también podría iniciar mecanismos patológicos, interactuar con la toxicidad amiloide o amplificarla en etapas avanzadas de la enfermedad (Mohandas et al., 2009).

Debido a su rol central, el A β se ha convertido en el objetivo terapéutico más común en ensayos clínicos. Para 2021, existían 126 agentes en evaluación clínica para el tratamiento de la EA; de ellos, el 29 % de los que se encontraban en fase 3 y el 17 % en fase 2 estaban dirigidos contra A β . Sin embargo, estos tratamientos enfrentan enormes dificultades: se estima que la tasa de fracaso de estos ensayos clínicos alcanza el 99 % (Wu et al., 2022). Aunque algunos fármacos han logrado

Introducción

reducir los niveles de A β , la mayoría no ha conseguido mejoras significativas en la memoria o la función cognitiva de los pacientes.

Un avance importante fue la aprobación de aducanumab por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 2021. Aducanumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une selectivamente a formas agregadas de A β (fibrilares y oligoméricas), facilitando su eliminación por la microglía. Fue el primer tratamiento aprobado que actúa directamente sobre la fisiopatología subyacente de la EA, y el primero desde 2003 en ser aprobado con un mecanismo distinto al sintomático.

No obstante, su aprobación fue altamente controvertida debido a la falta de eficacia clínica concluyente y preocupaciones sobre efectos adversos, como el riesgo de edema cerebral en pacientes con ciertas variantes del gen APOE (*Aduhelm Lawsuit*, n.d.).

Hipótesis de la cascada metabólica-mitocondrial

Según la hipótesis metabólica-mitocondrial de la enfermedad de Alzheimer, las neuronas afectadas presentan desde etapas tempranas alteraciones en la estructura, la producción de ATP y el transporte mitocondrial, lo que precipita un déficit energético y un aumento de especies reactivas de oxígeno que favorecen la neurodegeneración (Cabezas-Opazo et al., 2015). Además, se reconoce que la diabetes tipo 2 y otras patologías metabólicas —asociadas a resistencia insulínica e hiperinsulinemia— constituyen factores de riesgo para el desarrollo de Alzheimer, al comprometer el metabolismo cerebral y la señalización de la insulina (Luchsinger & Gustafson, 2009).

En este contexto, diversas investigaciones han explorado la administración intranasal de insulina como estrategia terapéutica, aprovechando su acceso directo al sistema nervioso central sin efectos sistémicos adversos.

Estudios piloto realizados por Reger y colaboradores mostraron mejoras en memoria verbal en pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) y EA, especialmente en aquellos no portadores del alelo APOE ϵ 4 (Reger et al., 2006). Además, se observaron efectos sobre biomarcadores plasmáticos de β -amiloide, lo que sugiere una modulación del metabolismo amiloide influenciada por el genotipo APOE. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar el perfil genético y el estado de resistencia a la insulina para optimizar la respuesta terapéutica.

Un ensayo clínico posterior más amplio, realizado por Craft et al., confirmó que la insulina intranasal puede preservar la actividad metabólica cortical (medida por PET-FDG) y mejorar funciones

cognitivas y habilidades funcionales en pacientes con DCL o EA leve, con efectos sostenidos tras finalizar el tratamiento (Craft et al., 2013).

Vías amiloidogénica y no amiloidogénica en la fisiopatología del Alzheimer

Como fue mencionado, una de las hipótesis más sostenidas y exploradas en la fisiopatología de la EA es la de la cascada amiloide, un péptido potencialmente neurotóxico derivado del procesamiento anómalo de la APP. Esta glicoproteína transmembrana, ampliamente expresada en diversos tejidos, cumple funciones fisiológicas esenciales, entre ellas la modulación de la plasticidad sináptica, el tráfico axonal y la señalización intracelular.

En condiciones normales, APP puede ser procesada a través de dos rutas enzimáticas diferentes, que configuran vías competitivas con consecuencias fisiopatológicas opuestas: la vía amiloidogénica y la no amiloidogénica (Fig. 4).

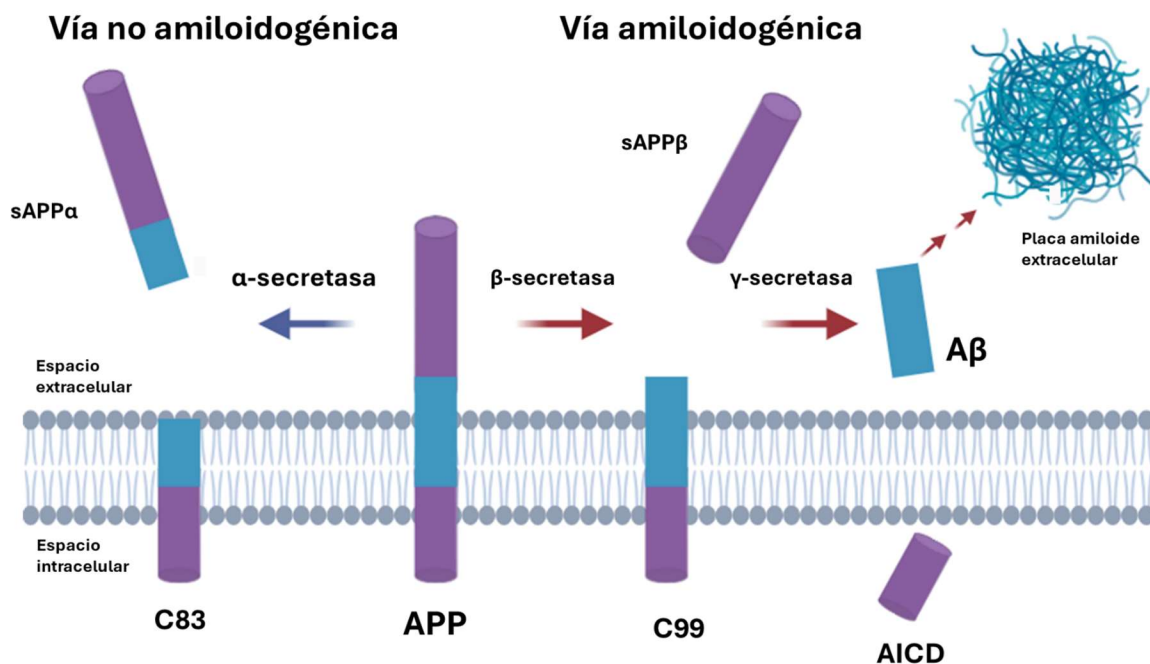


Figura 4. Vía amiloidogénica y no amiloidogénica. La proteína precursora de amiloide (APP) es una proteína transmembrana. En la vía no amiloidogénica (izquierda), la APP es escindida por α -secretasa, generando el fragmento C83 anclado a la membrana y liberando al espacio extracelular la APP soluble

alfa (sAPP α). En la vía amiloidogénica (derecha), la APP es escindida inicialmente por la β -secretasa (BACE1). El fragmento C99 es posteriormente escindido por la γ -secretasa, compuesta por Presenilina 1 o 2, Nicastrina, PEN2 y APH-1. Este procesamiento proteolítico libera A β al espacio extracelular. El dominio intracelular de APP (AICD), derivado de la escisión inicial por β -secretasa, se libera al espacio intracelular (Imagen basada en Hampel et al., 2021).

La vía amiloidogénica se activa cuando APP es escindida secuencialmente por las enzimas β -secretasa (BACE1) y γ -secretasa. Este doble procesamiento da lugar a la generación de fragmentos A β de diferente longitud, entre los cuales A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ son los más representativos. Este último, por su mayor tendencia a la agregación, se ha vinculado estrechamente al inicio de procesos neurodegenerativos característicos de la EA. En el contexto patológico, una sobreproducción o una depuración deficiente de A β favorece su acumulación extracelular en forma de placas amiloides, un sello distintivo de la enfermedad. Sin embargo, investigaciones más recientes han desplazado el foco de atención hacia las formas oligoméricas solubles de A β , las cuales se consideran aún más tóxicas por su capacidad de alterar la sinapsis y desencadenar respuestas neuroinflamatorias (Takeda et al., 2021).

Este procesamiento amiloidogénico puede ser exacerbado por mutaciones genéticas, como aquellas que afectan directamente al gen APP localizado en el cromosoma 21, lo que en parte explica la mayor prevalencia de Alzheimer en personas con síndrome de Down. A nivel molecular, también se ha identificado un papel emergente de la δ -secretasa, la cual actúa como facilitador del procesamiento por β -secretasa, amplificando la formación de A β (Z. Zhang et al., 2015).

En contraposición, la vía no amiloidogénica representa un mecanismo alternativo y, en términos fisiopatológicos, protector. En esta vía, la APP es escindida por la α -secretasa, una metaloproteasa perteneciente a la familia ADAM (principalmente ADAM10), que corta la proteína en un sitio que impide la formación de A β . El resultado de esta escisión es la generación del fragmento sAPP α , de naturaleza neuroprotectora, y de un fragmento C-terminal (CTF α) (Fig. 4).

El equilibrio entre estas dos rutas de procesamiento de la APP —amiloidogénica y no amiloidogénica— parece ser decisivo para el destino funcional o patológico de la proteína. Diversos factores endógenos y ambientales, como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, el envejecimiento y ciertas condiciones epigenéticas, pueden inclinar la balanza hacia una mayor actividad de β -secretasa y γ -secretasa, o una disminución de la actividad α -secretasa, promoviendo así la neurodegeneración.

A pesar de los avances, el conocimiento sobre los mecanismos reguladores que determinan la ruta que sigue la APP sigue siendo incompleto. Sin embargo, la caracterización de estos procesos es crítica, ya que no solo ofrece explicaciones plausibles para la patogénesis del Alzheimer, sino que también abre el camino a nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a restaurar el equilibrio del procesamiento proteico.

Modelos animales de la EA

Una de las mayores dificultades en la investigación sobre la EA es que esta enfermedad no ocurre espontáneamente en los animales de laboratorio más comúnmente utilizados como las ratas y los ratones (Pádua et al., 2024). Sólo algunas especies como perros, gatos y primates no humanos exhiben demencia asociada al envejecimiento con características parcialmente similares. Los modelos habitualmente utilizados para la EA esporádica requieren intervenciones como la inducción de inflamación cerebral mediante toxinas o agentes proinflamatorios, que activan respuestas crónicas pero inespecíficas, o la inyección intracerebral directa de péptidos amiloides o proteínas tau hiperfosforiladas. Estas aproximaciones presentan limitaciones en la validez traslacional, ya que separan artificialmente procesos que en humanos interactúan durante décadas.

Estas limitaciones en los modelos de EA esporádica han llevado al uso predominante de modelos transgénicos que imitan la EA familiar. Estos modelos se han logrado mediante la introducción en ratones y en menor medida en ratas de genes mutados de APP, de tau o de presenilinas que favorecen la patología amiloide y la formación de ovillos neurofibrilares (Foidl & Humpel, 2019). Estos modelos han permitido avanzar en la comprensión de la fisiopatología de la EA y en la evaluación preclínica de terapias, aunque presentan limitaciones para el estudio de la forma esporádica, mucho más frecuente en la población general.

Alteraciones metabólicas cerebrales

EA y el envejecimiento fisiológico

El envejecimiento fisiológico constituye el principal factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía, que representa más del 95% de los casos diagnosticados. Tanto el envejecimiento como la EA comparten alteraciones en mecanismos celulares y moleculares que comprometen la homeostasis metabólica cerebral, incluyendo la senescencia celular, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la resistencia a la insulina cerebral.

Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

A medida que avanza la edad, el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los mecanismos antioxidantes que las neutralizan se vuelve cada vez más frágil, particularmente en células altamente diferenciadas como las células que constituyen el sistema nervioso. Este desbalance da lugar al estrés oxidativo, un proceso que desempeña un papel clave en la progresiva disfunción metabólica del cerebro envejecido. Debido a su alta demanda energética, su limitada capacidad de renovación celular y la naturaleza postmitótica de las neuronas, el tejido cerebral se vuelve especialmente susceptible al daño oxidativo acumulativo (R.-M. Liu, 2022).

La acumulación de ROS no solo afecta lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, sino que también puede inducir senescencia en distintos tipos celulares del sistema nervioso, incluyendo progenitores neuronales, astrocitos y neuronas maduras. En modelos murinos, por ejemplo, se ha demostrado que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ aumentan la producción de ROS y activan rutas de daño celular como la quinasa p38, promoviendo la entrada en senescencia de células madre neuronales del hipocampo (He et al., 2013). De forma similar, en cultivos de astrocitos humanos, la exposición a $A\beta_{1-40}$ incrementa la expresión de p53 y favorece un fenotipo senescente mediado por estrés oxidativo, un efecto que puede ser parcialmente revertido por antioxidantes como la galantamina (Y. Zhang et al., 2017).

Resistencia a la insulina cerebral

Entre los mecanismos compartidos por el envejecimiento cerebral y la EA, se destaca la aparición progresiva de resistencia a la insulina en el sistema nervioso central. En cerebros envejecidos sin

demencia se ha observado una disminución en la expresión y actividad del receptor de insulina (IR), así como de componentes de su vía de señalización, especialmente en regiones vulnerables como el hipocampo y la corteza prefrontal (Frölich et al., 1998). Además, se ha registrado un aumento en la fosforilación inhibitoria de IRS-1 en residuos de serina, un marcador clásico de resistencia a insulina (Moloney et al., 2010a). Estos cambios, aunque más sutiles que en la EA, podrían comprometer gradualmente la eficiencia metabólica y la función cognitiva. Estudios con tomografía por emisión de positrones (PET-FDG) han demostrado una reducción leve del metabolismo de glucosa en adultos mayores sanos, posiblemente vinculada a estas alteraciones en la señalización de insulina (Baker et al., 2011). Estos hallazgos apoyan la noción de que la resistencia a la insulina cerebral comienza como parte del envejecimiento fisiológico y se intensifica en el contexto de la EA, contribuyendo así a la vulnerabilidad progresiva del cerebro envejecido.

En conjunto, el envejecimiento fisiológico y la EA comparten múltiples alteraciones metabólicas que afectan la homeostasis cerebral, como la senescencia celular, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la resistencia a la insulina cerebral. Estas coincidencias sugieren que la EA podría representar una exacerbación patológica de procesos ya presentes en el envejecimiento (Fig. 5).

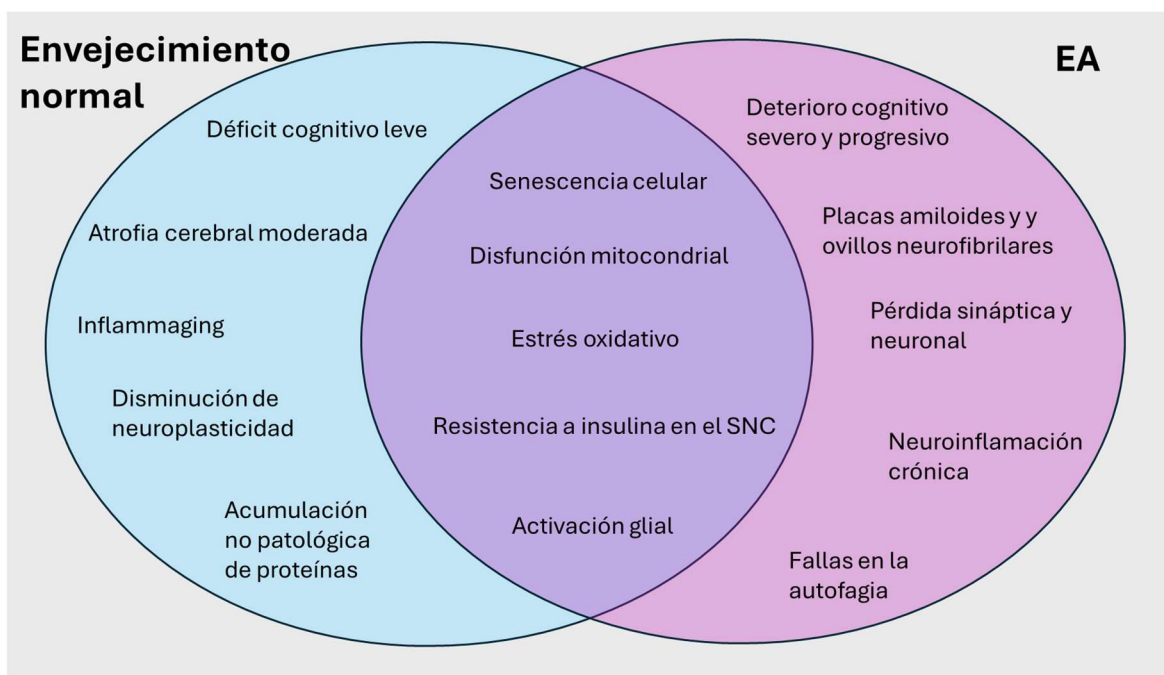


Figura 5. Características diferenciales y compartidas entre el envejecimiento normal y la enfermedad de Alzheimer. El diagrama de Venn ilustra los procesos exclusivos del envejecimiento

fisiológico (izquierda), los específicos de la patología de Alzheimer (derecha) y los mecanismos celulares y moleculares compartidos en la intersección. Se destacan alteraciones comunes como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la inflamación y la resistencia a la insulina cerebral, que en el envejecimiento son moderadas y compensadas, pero que en Alzheimer se agravan y contribuyen a la neurodegeneración progresiva.

EA y diabetes mellitus tipo 2

Algunos autores han propuesto que la EA puede considerarse una forma de "diabetes tipo 3" (de la Monte, 2014), debido a alteraciones similares en la señalización de insulina observadas en ambas enfermedades. La insulina cerebral modula funciones críticas como el consumo de glucosa, la plasticidad sináptica y la memoria.

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se caracteriza por hiperglucemia crónica y resistencia a la insulina, condiciones que afectan no solo a órganos tradicionalmente estudiados en este contexto (como el hígado, músculo esquelético o tejido adiposo) sino también al sistema nervioso central. En particular, se han reportado alteraciones en dominios cognitivos como la memoria, la atención y la función ejecutiva (Salas & De Strooper, 2019). Estudios poblacionales, como el de Rotterdam (Euser et al., 2010) y el de Honolulu-Asia (Peila et al., 2002), mostraron un aumento significativo en el riesgo de desarrollar EA en personas con DM2. Aunque los mecanismos precisos aún no se comprenden del todo, se proponen como vías comunes la disfunción vascular, las alteraciones en el metabolismo de la glucosa, la alteración en la señalización de insulina y procesos amiloidogénicos compartidos. No obstante, las evidencias clínicas siguen siendo heterogéneas y aún se debate cómo estos factores contribuyen al vínculo entre ambas enfermedades.

Alteraciones vasculares y estructurales del cerebro

La DM2 contribuye al deterioro cognitivo también a través de cambios vasculares. Se ha demostrado una mayor prevalencia de microangiopatía cerebral, angiopatía amiloide y aumento del riesgo de infartos cerebrales en pacientes diabéticos (Biessels & Reijmer, 2014). Estas alteraciones vasculares impactan negativamente la perfusión cerebral y pueden favorecer la aparición de lesiones estructurales vinculadas con la EA.

Técnicas de imagen como la resonancia magnética han revelado pérdida de volumen cerebral, particularmente en el hipocampo y la corteza, en pacientes con DM2 (de Bresser et al., 2010). Sin

embargo, esta atrofia no siempre se correlaciona con pérdida neuronal, ya que puede deberse también a alteraciones en la materia blanca, conectividad funcional reducida o pérdida glial.

Alteraciones en el metabolismo de la glucosa y del glucógeno cerebral

En la DM2, la hiperglucemia crónica y la resistencia a la insulina se acompañan de una reducción en la captación y utilización de glucosa por el cerebro. Estudios con [^{18}F]-FDG PET han demostrado una disminución en la tasa metabólica cerebral de glucosa en regiones típicamente afectadas por la EA, como la corteza temporoparietal y el cíngulo posterior (Baker et al., 2011) (Fig. 6). El hipometabolismo cerebral está asociado a un mayor riesgo de EA y puede observarse años antes del inicio de la demencia en las mismas regiones cerebrales afectadas en pacientes con DM2 (Minoshima et al., 1997). Por tanto, la reducción en la tasa metabólica de glucosa cerebral observada en pacientes diabéticos podría ser un factor predisponente para la EA.

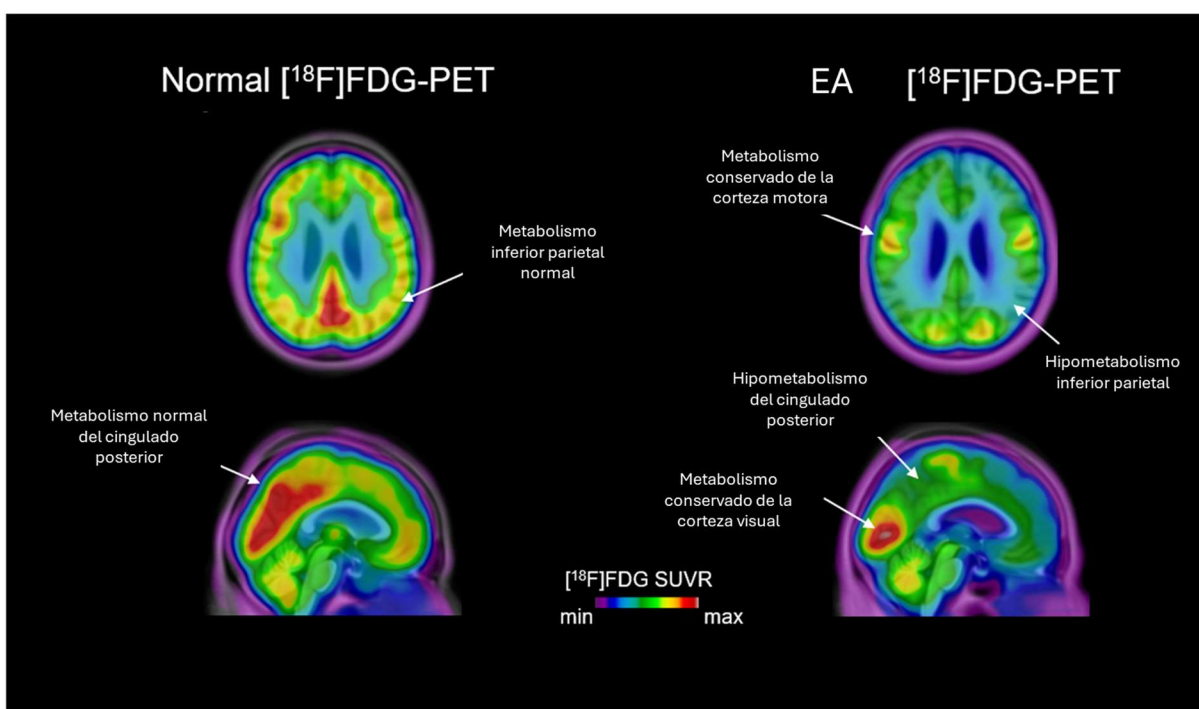


Figura 6. Imágenes representativas de tomografía por emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa ([^{18}F]FDG-PET) en un sujeto de control (izquierda) y en un paciente con enfermedad de Alzheimer avanzada (derecha). La [^{18}F]FDG-PET mide el metabolismo de la glucosa por neuronas y astrocitos, y una disminución de la señal cerebral de [^{18}F]FDG-PET suele interpretarse como un signo de neurodegeneración. Las áreas de metabolismo anormal incluyen regiones posteriores, como la corteza del cíngulo posterior y las cortezas parietales laterales. Además, se observa una reducción del

Introducción

metabolismo en las cortezas temporales laterales mientras estas regiones son normales en el sujeto de control. Asimismo, cabe destacar que las áreas sensoriales primarias, como la corteza visual y la banda sensoriomotora, están relativamente preservadas en pacientes con Alzheimer. Esto ayuda a los médicos de medicina nuclear a identificar el patrón característico de la FDG-PET (Imagen modificada de Nobili et al., 2018).

Si bien el hipometabolismo cerebral ha predominado en las descripciones de la progresión de la enfermedad de Alzheimer, en los últimos años ha cobrado relevancia el estudio del hipermetabolismo y su posible papel patofisiológico. Corriveau-Lecavalier et al. muestran que, en fases preclínicas y de deterioro cognitivo leve, surge un patrón de hiperactivación —reflejado como aumento de la señal BOLD en fMRI— en regiones clave como el hipocampo y la corteza parietal, siguiendo un curso que culmina en hipoactivación a medida que se acumula patología tau (Corriveau-Lecavalier et al., 2024).

Por otro lado, el glucógeno cerebral, localizado principalmente en astrocitos, actúa como una reserva energética que puede mobilizarse rápidamente ante aumentos de la demanda neuronal o eventos de hipoglucemia. En condiciones normales, este *pool* glucogénico permite sostener la neurotransmisión glutamatérgica y facilita la plasticidad sináptica y la formación de la memoria.

En modelos animales de resistencia a la insulina, como las ratas Zucker obesas y las ratas Goto-Kakizaki, se ha reportado una reducción del glucógeno en el hipocampo, la corteza y el cerebelo (Lizarbe et al., 2019). Esta alteración se asocia con déficits cognitivos, disfunción sináptica e ineficiencia en el reciclaje de glutamato-glutamina. Se ha identificado una relación funcional entre la glucogenólisis astrocítica y el transportador de glutamato GLT-1, que puede estar comprometida en la DM2.

Resistencia a la insulina cerebral

Uno de los mecanismos patogénicos más discutidos que podría conectar la DM2 con la EA es la resistencia a la insulina en el cerebro. Aunque históricamente se sostuvo que el cerebro era insensible a la insulina —ya que el metabolismo de la glucosa cerebral opera principalmente de forma insulino-independiente— numerosas investigaciones han demostrado que esta hormona cumple funciones clave en el cerebro, particularmente en la regulación del apetito y la cognición (Banks et al., 2012).

Estudios en modelos animales indican que la insulina cerebral proviene en su mayoría de la circulación periférica y atraviesa la barrera hematoencefálica a través de un transporte mediado por receptores, que es un proceso limitado por saturación (Banks et al., 1997).

Cuando la insulina se une a su receptor en la membrana celular, este se activa y pone en marcha una serie de señales internas. Primero recluta a IRS, que a su vez activa la enzima PI3K. PI3K genera una molécula llamada PIP₃ que atrae a la proteína Akt hasta la membrana, donde recibe dos “interruptores” químicos: uno de PDK1 y otro de mTORC2. Estos interruptores (fosforilaciones en T308 y S473) encienden por completo a Akt. En particular, el marcador S473 suele usarse para medir qué tan bien funciona toda esta vía de señalización de la insulina (Scherer et al., 2021) (Fig. 7).

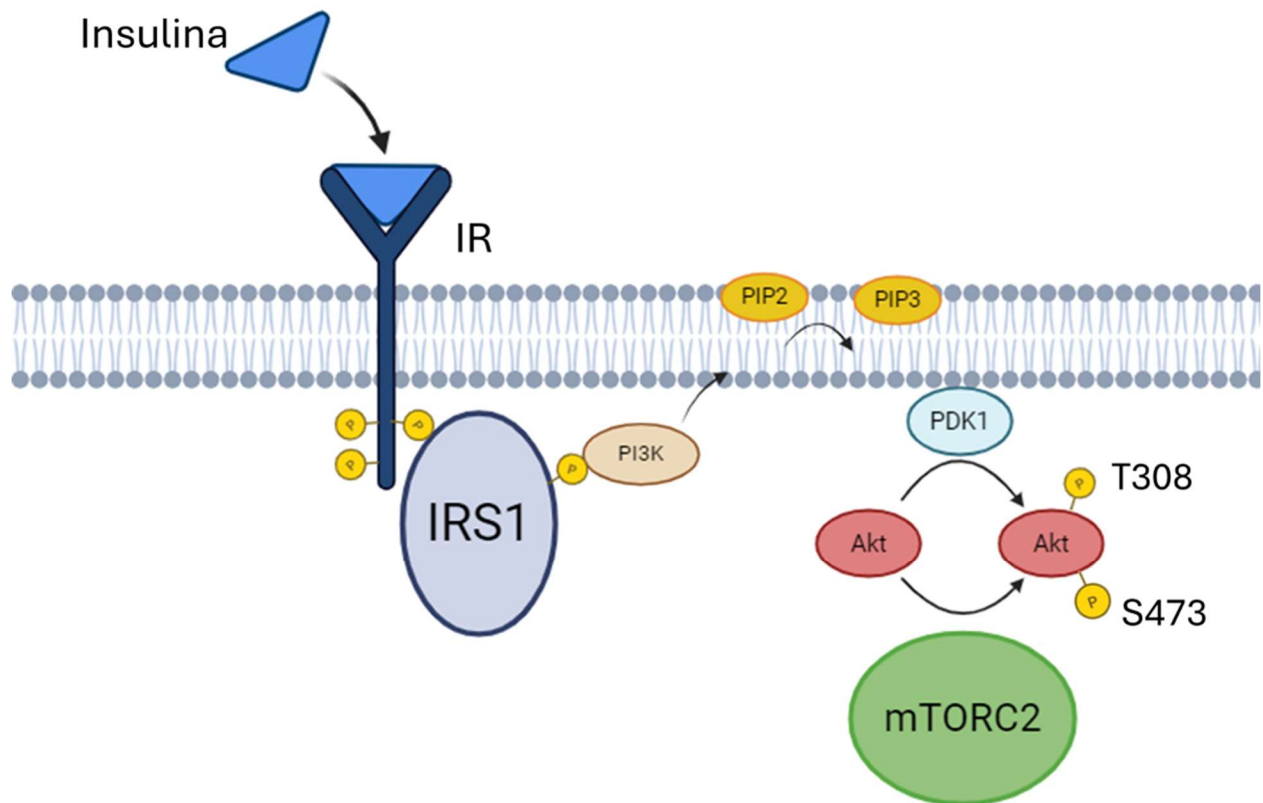


Figura 7. Esquema simplificado de la vía de señalización de la insulina que conduce a la activación de Akt. La unión de insulina al receptor (IR) activa una cascada intracelular que incluye la fosforilación de IRS, la activación de PI3K y la generación de PIP₃. Este lípido permite el reclutamiento de Akt a la membrana, donde es fosforilada en T308 por PDK1 y en S473 por mTORC2, lo que resulta en su activación completa (Imagen basada en Scherer et al., 2021).

En la década de 1980, Wallum y colegas comprobaron que una infusión intravenosa de insulina elevaba los niveles de esta hormona en el líquido cefalorraquídeo en sujetos sanos (Wallum et al., 1987). Sin embargo, aún no está claro cómo afecta la hiperinsulinemia crónica y la resistencia periférica a la insulina a la señalización cerebral de esta hormona.

Investigaciones *post mortem* han demostrado una disminución significativa de la vía PI3K/Akt en la corteza frontal de personas con DM2, lo que apunta a la existencia de resistencia a la insulina a nivel cerebral (Y. Liu et al., 2011). En la EA también se han identificado alteraciones en esta vía, aunque los resultados varían entre estudios: algunos informan niveles reducidos de ARNm de insulina y su receptor en el cerebro de pacientes con EA (Steen et al., 2005a), mientras que otros no encuentran diferencias en la cantidad o activación del receptor de insulina (Ho et al., 2012).

Uno de los hallazgos más sólidos en esta línea es la disminución del sustrato del receptor de insulina (IRS) en cerebros con EA, junto con un aumento en la fosforilación de IRS-1 en residuos de serina, lo que indica una señal clara de resistencia a la insulina (Moloney et al., 2010).

En conjunto, la DM2 y la EA comparten múltiples alteraciones metabólicas que han llevado a proponer el concepto de “diabetes tipo 3” para describir la EA. Ambas patologías presentan resistencia a la insulina, hipometabolismo cerebral de glucosa, disfunción vascular y acumulación de amiloide, lo que sugiere mecanismos patológicos superpuestos (Fig. 8). Estas similitudes se reflejan en cambios estructurales y funcionales del cerebro, y en la afectación de la memoria y otras funciones cognitivas.

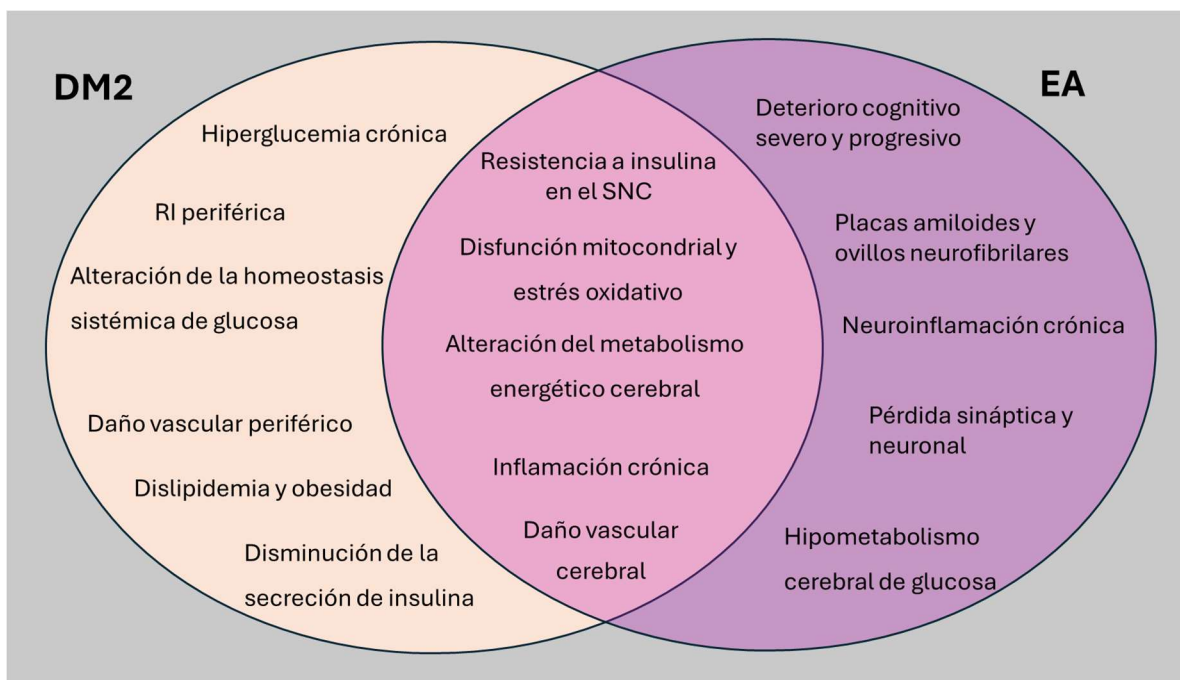


Figura 8. Características diferenciales y compartidas entre la diabetes mellitus 2 y la enfermedad de Alzheimer. Diagrama de Venn que ilustra las características distintivas y compartidas entre la DM2 y la enfermedad de Alzheimer (EA). Las áreas no superpuestas reflejan procesos patológicos específicos de cada condición, como la hiperglucemia crónica y la resistencia periférica a la insulina en DM2, y la acumulación de β -amiloide y tau en EA. La intersección destaca mecanismos comunes como la resistencia a la insulina cerebral, el estrés oxidativo, la inflamación crónica, y el déficit energético neuronal, evidenciando un eje metabólico compartido entre ambas patologías.

Acción de la insulina en el cerebro

Además de su función predominante como reguladora de la glucemia, la insulina desempeña un papel crucial en el sistema nervioso central como modulador de procesos tróficos y metabólicos. En el cerebro, actúa como un factor de crecimiento que participa activamente en la supervivencia celular, la función sináptica, la plasticidad neuronal y la respuesta frente al estrés oxidativo (Carro & Torres-Aleman, 2004; Hölscher, 2014; Schubert et al., 2004). Esta acción se lleva a cabo mediante la activación del receptor de insulina (IR), el cual está ampliamente distribuido tanto en neuronas como en células gliales (Kullmann et al., 2020).

Introducción

Las células endoteliales cerebrales poseen sitios de unión para insulina que cumplen dos funciones distintas: actuar como transportadores de insulina a través de la barrera hematoencefálica (BHE) y como receptores clásicos (Fig. 9).

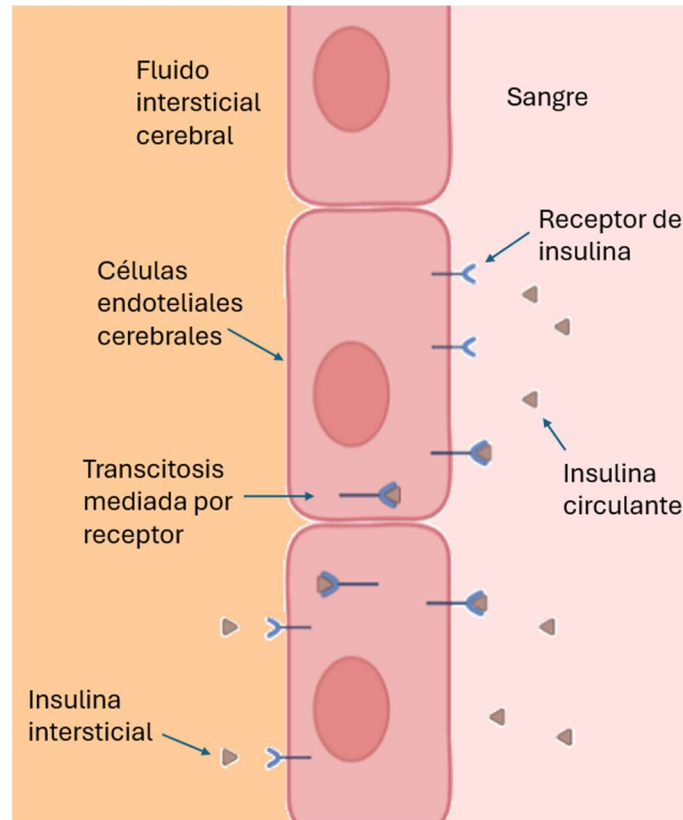


Figura 9. La insulina de origen periférico puede atravesar la barrera hematoencefálica utilizando un sistema de transporte mediado por receptores. Una vez que la insulina o el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) se unen a sus respectivos receptores, se desencadenan dos vías de señalización fundamentales: la de PI3K/Akt, vinculada al metabolismo celular y la supervivencia, y la de MAPK, relacionada con la proliferación celular y la función mitocondrial (Hölscher, 2019; Kullmann et al., 2020) (Fig. 10). A través de estas rutas, tanto la insulina como el IGF-1 estimulan procesos esenciales como la captación de glucosa, la síntesis de proteínas y lípidos, la autofagia y la inhibición de la apoptosis (Heras-Sandoval et al., 2014; Najem et al., 2014).

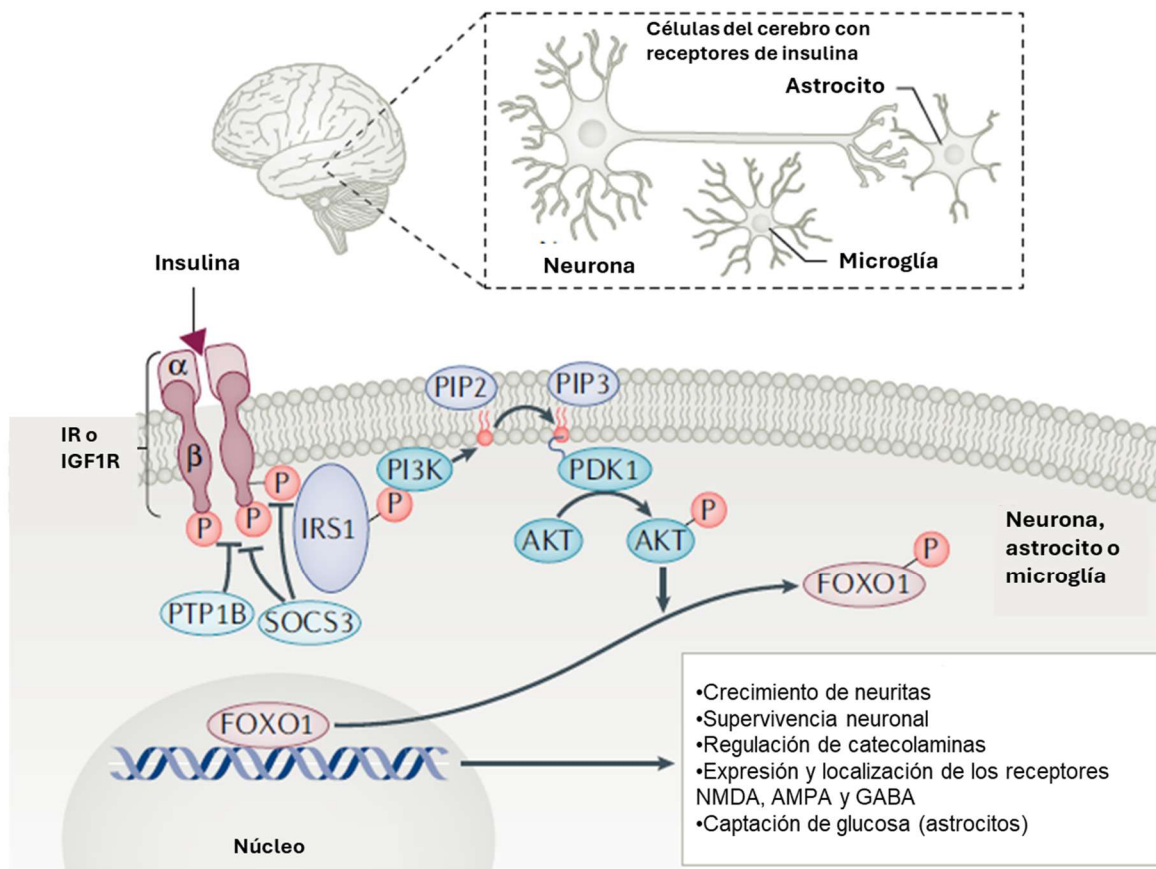


Figura 10. Cascada de señalización de insulina en el cerebro. Los receptores de insulina se encuentran en muchas regiones y tipos celulares del cerebro. La insulina ejerce su acción celular al unirse a la subunidad α del receptor de insulina (IR), lo que conduce a la activación de la tirosina quinasa del receptor, causando autofosforilación del mismo en residuos de tirosina y la fosforilación en tirosina de las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS). En cambio, la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) y el supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3) desfosforilan e inactivan el receptor de insulina. Los sitios tirosina fosforilados en las proteínas IRS permiten la unión de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que convierte el fosfatidilinositol (3,4)-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PIP3) en la membrana plasmática. Este proceso recluta a la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK1), que fosforila a Akt, nodo clave de la señalización. Akt regula varias proteínas de la vía de señalización de la insulina, como el factor de transcripción FOXO1, que, tras su fosforilación, es excluido del núcleo, lo que resulta en la inhibición de la transcripción mediada por FOXO1 de genes que regulan diversas funciones neuronales (imagen adaptada de Scherer et al., 2021).

En el cerebro, los IR son abundantes en general, pero se encuentran particularmente enriquecidos en el bulbo olfatorio, el hipotálamo, el hipocampo, el cerebelo, la amígdala y la corteza cerebral (Duarte et al., 2012). La evidencia creciente sugiere que la concentración regional específica de los IR refleja funciones diferenciadas asociadas a cada región cerebral (Akintola & van Heemst, 2015). La alta concentración de IR en el hipotálamo y en el sistema límbico—incluyendo el hipocampo, la corteza piriforme y la amígdala—, regiones que se conectan y comunican entre sí, sugiere una posible implicancia en el control emocional y en funciones cognitivas superiores, como el aprendizaje y la memoria (Wickelgren, 1998).

La elevada concentración de IR en el hipocampo, estructura clave en el procesamiento de la memoria espacial, apoya la hipótesis del papel de la insulina en el aprendizaje y la memoria declarativa.

La disfunción en estas vías puede dar lugar a un estado de resistencia a la insulina cerebral, que, como se mencionó anteriormente, es un fenómeno que se ha asociado tanto con deterioro cognitivo como con alteraciones metabólicas sistémicas. Estudios experimentales en animales han demostrado que la resistencia específica del hipocampo a la insulina produce alteraciones en el aprendizaje espacial, incluso en ausencia de cambios en la sensibilidad periférica (Kullmann et al., 2020). Esta evidencia sugiere que la resistencia central a la insulina puede preceder o independizarse de la periférica, siendo un evento temprano en la fisiopatología de la EA (Hölscher, 2019).

Acción de la insulina en los astrocitos

Los astrocitos expresan IR funcionales y responden a su activación modulando el metabolismo energético local, regulando la captación y distribución de glucosa, la actividad mitocondrial y la comunicación con las neuronas (Hölscher, 2019; Kullmann et al., 2020). Además, a través de la señalización de insulina, los astrocitos pueden influir en la expresión de genes antioxidantes vía activación del promotor Nrf2, contribuyendo a la protección frente al estrés oxidativo (Song et al., 2018).

Así, la insulina cerebral—y su interacción con los astrocitos— representa un eje fundamental en el mantenimiento de la homeostasis energética del sistema nervioso central. Su deterioro compromete no solo el funcionamiento neuronal, sino también la capacidad de la glía para sostener la actividad sináptica y proteger al tejido frente a agresiones metabólicas. En consecuencia,

comprender la dinámica de esta señalización resulta clave para dilucidar mecanismos tempranos en la progresión de la EA, donde la resistencia a la insulina cerebral y la disfunción astrocitaria podrían actuar como desencadenantes de una cascada neurodegenerativa.

Resistencia a insulina en el cerebro

Dado que solo entre el 1 y el 5 % de los casos de EA se vinculan a mutaciones claramente definidas (APP o presenilina-1) (Blennow et al., 2006), la gran mayoría de las veces la EA se considera una condición “esporádica” influenciada por factores ambientales. Esto plantea la pregunta: ¿qué factores externos contribuyen a iniciar y perpetuar la EA, y cómo se conecta esto con el envejecimiento y la DM2?

Una respuesta unificadora es la resistencia a la insulina cerebral, un fenómeno que aparece en las primeras etapas de la EA y que, como se mencionó anteriormente, también se observa en el envejecimiento y en la DM2 (Blázquez et al., 2014). La desensibilización a la insulina en el cerebro compromete la señalización de factores de crecimiento, la utilización de glucosa y la regulación antiinflamatoria, creando un ambiente propicio para la neurodegeneración.

Inflamación crónica y bloqueo de la señalización de insulina

La exposición crónica a desencadenantes inflamatorios desata una respuesta persistente que resulta perjudicial para las neuronas y favorece la resistencia insulínica cerebral (Akiyama et al., 2000). La inflamación crónica activa la microglía, que libera óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias, inhibiendo la señalización de factores de crecimiento como la insulina (Cunningham et al., 2005) (Fig. 11). Esto contribuye a que las neuronas y las células gliales pierdan sensibilidad a dicha hormona, reforzando un círculo vicioso de daño oxidativo y neuroinflamación.

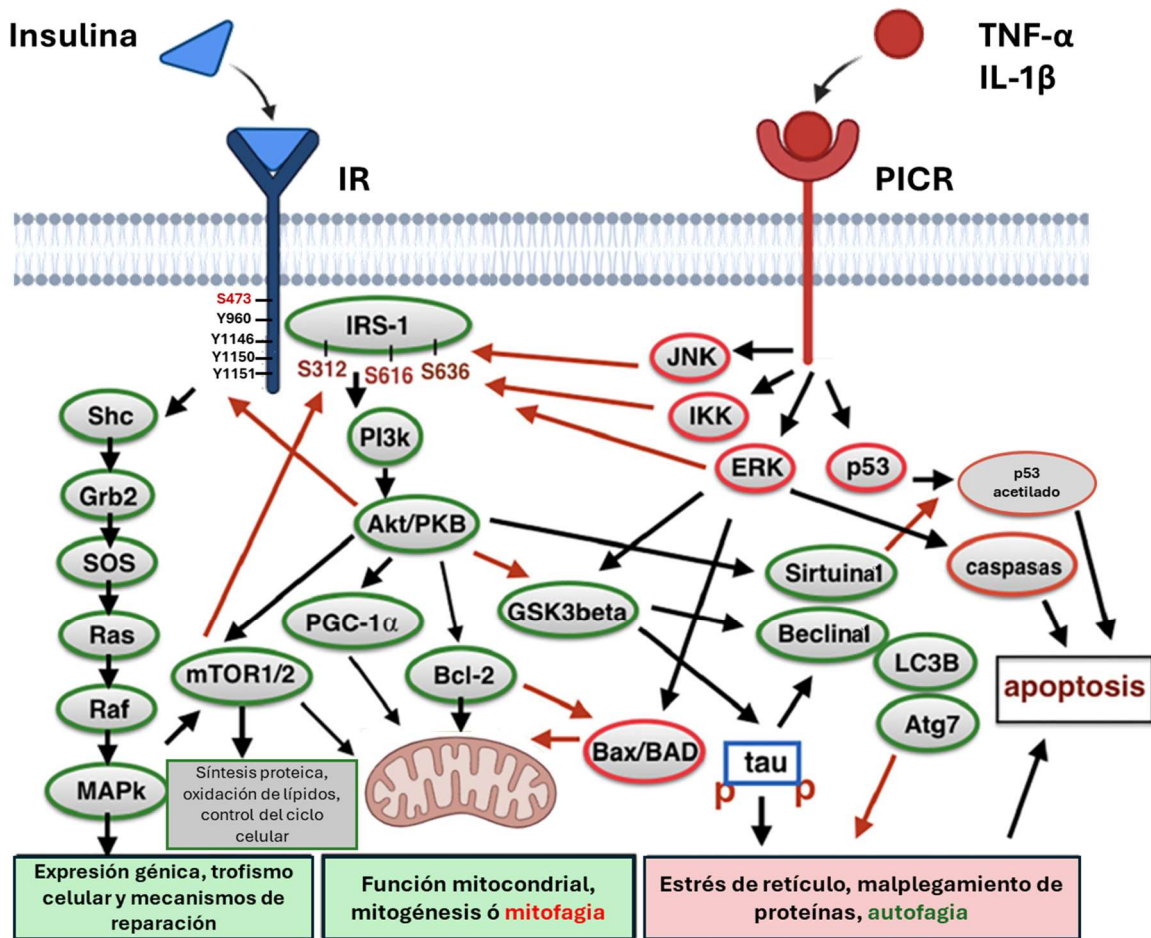


Figura 11. La señalización de insulina y la señalización proinflamatoria se contrarrestan entre sí.

La activación del receptor de insulina (IR) conduce a su autofosforilación y activación. Varias otras quinasas pueden activar o inactivar este receptor. El sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) también contiene múltiples sitios de fosforilación que pueden activar o inhibir las señales de segundos mensajeros. La señalización descendente activa procesos fisiológicos clave como el uso de energía, la función y renovación mitocondrial, la síntesis proteica y la autofagia, así como su inhibición. La activación de receptores de citoquinas proinflamatorias (PICR) contrarresta estos procesos y promueve la mitofagia, la autofagia y la apoptosis. Quinasas como JNK e IKK pueden fosforilar IRS-1 para inhibir la señalización de insulina e inducir desensibilización a la insulina (imagen basada en Hölscher, 2019).

Competencia directa del péptido A β por el receptor de insulina

Los péptidos β -amiloides implicados en la EA no solo se acumulan patológicamente en el cerebro, sino que también interfieren directamente con mecanismos moleculares fundamentales como la señalización de insulina (Xie et al., 2002a).

El análisis de las secuencias de la insulina y de A β_{1-40} y A β_{1-42} revela que comparten una secuencia consenso común con los sustratos de la enzima degradadora de insulina (IDE) (Kurochkin, 1998). Esta enzima se ha asociado con la EA debido a su capacidad para degradar A β (Qiu et al., 1998). Considerando estos vínculos entre la insulina y A β , resulta interesante señalar que un evento característico de la EA es la reducción del metabolismo de la glucosa en el cerebro (Minoshima et al., 1999), lo cual podría estar asociado a un defecto en la acción de la insulina (Frölich et al., 1998).

Si existiera una competencia directa, el péptido A β interferiría con la activación eficiente del IR, impidiendo que esta hormona desencadene la cascada de señalización intracelular mediada por IRS-1, PI3K y Akt, tanto en astrocitos como en neuronas. En un estudio clave, Xie et al. demostraron esta competencia al purificar A β_{1-40} , A β_{1-42} y receptores humanos de insulina, y realizar ensayos de unión *in vitro* con concentraciones crecientes de insulina, analizando luego los inmunoprecipitados (Xie et al., 2002a). Los resultados mostraron que A β compite directamente con la insulina por su sitio de unión en el receptor, inhibiendo su acción.

Si este hallazgo *ex vivo* se replicara en la patología, la interferencia en la vía insulínica tendría consecuencias metabólicas importantes para el cerebro. Al reducir la señalización de insulina, el A β contribuiría a un estado funcionalmente similar al de resistencia a la insulina, caracterizado por una menor captación y utilización de glucosa, un rasgo distintivo del hipometabolismo observado en la EA.

Relevancia de los astrocitos en el metabolismo energético cerebral

En las últimas décadas, los astrocitos han dejado de ser considerados meros elementos de soporte en el sistema nervioso central para ocupar un lugar clave en la comprensión de la fisiología cerebral. Estas células gliales participan activamente en el mantenimiento de la homeostasis del entorno neuronal, regulando a una amplia gama de procesos como la proliferación, diferenciación y migración neuronales, la guía axonal, la neuroprotección, la formación y eliminación de sinapsis, así como la plasticidad y transmisión sináptica, tanto durante el desarrollo como en la vida adulta (Araque et al., 1999) (Fig. 12).

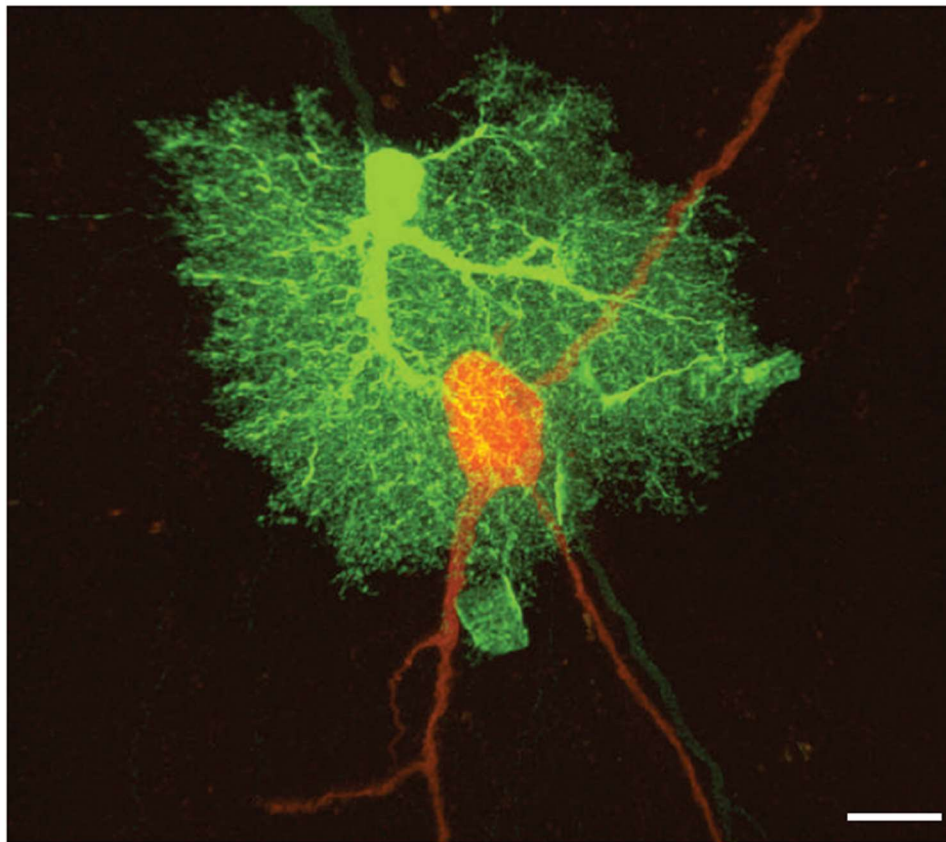


Figura 12. Micrografía representativa de un astrocyto protoplasmático (en verde) envolviendo el soma y los procesos de una neurona (en rojo). La estructura ramificada de los astrocitos, evidente en esta imagen, les permite formar dominios distintos en el cerebro. Barra de escala: 10 μm (imagen de Allen & Barres, 2009).

Este conjunto de funciones no se ejerce de manera aislada, sino a través de una interacción continua, dinámica y bidireccional con las neuronas y otros tipos celulares. En este marco, los astrocitos han sido reconocidos como componentes esenciales de la denominada *sinapsis*

Introducción

tripartita, un modelo que amplía la concepción clásica de la sinapsis para incluir, junto a la neurona presináptica y postsináptica, a los procesos astrocíticos que rodean la hendidura sináptica y regulan su microambiente (Fig.13).

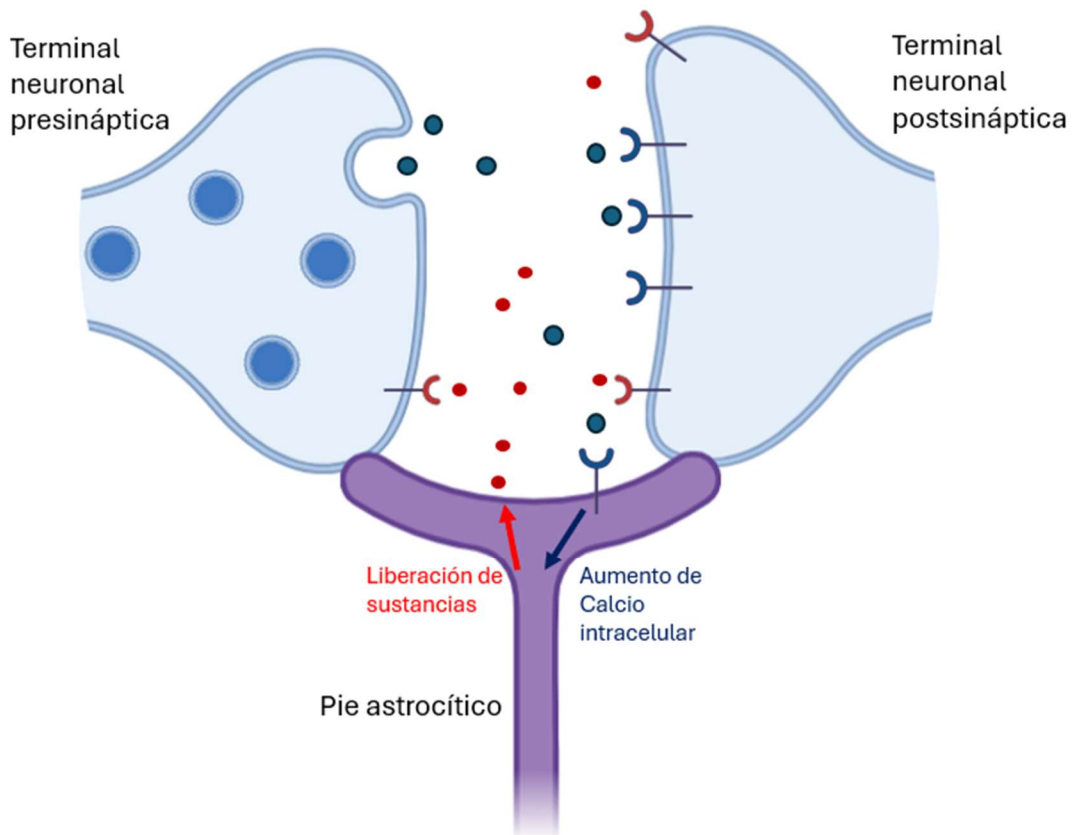


Figura 13. Sinapsis tripartita. Los astrocitos expresan muchos de los mismos receptores que las neuronas. Cuando los neurotransmisores son liberados desde la terminal presináptica de una neurona, se cree que activan receptores en los astrocitos, lo que provoca un aumento de iones de calcio en su interior y la liberación de diversas sustancias activas, como ATP, que actúan sobre las neuronas para inhibir o potenciar su actividad. Además, los astrocitos liberan proteínas que controlan la formación de sinapsis, regulan la función presináptica y modulan la respuesta de la neurona postsináptica a los neurotransmisores (imagen basada en Allen & Barres, 2009).

Más recientemente, este modelo fue ampliado bajo la noción de *cuna sináptica*, un complejo multicelular aún más amplio, que incluye microglía perisináptica, procesos de oligodendrocitos y

matriz extracelular, todos ellos interrelacionados para sostener, moldear y proteger el entorno sináptico (Nedergaard & Verkhratsky, 2012).

Los astrocitos, integrados de manera funcional en las redes neuronales, participan en múltiples niveles del control sináptico: regulan el volumen del espacio extracelular, regulan la concentración de iones como K^+ y H^+ , captan neurotransmisores como glutamato, GABA y adenosina para evitar su acumulación excesiva, y aseguran el reciclaje de precursores metabólicos como el glutatión. Además, desempeñan un papel crucial en el acoplamiento neurovascular, modulando el flujo sanguíneo en función de la actividad neuronal, y conforman una primera línea de defensa inmunológica en cooperación con la microglía y el sistema linfático meníngeo. En respuesta a señales locales, los astrocitos detectan cambios químicos mediante receptores específicos y activan cascadas intracelulares que les permiten liberar gliotransmisores y ajustar su fenotipo funcional según las demandas de la sinapsis (Fig. 14) (González-García et al., 2021).

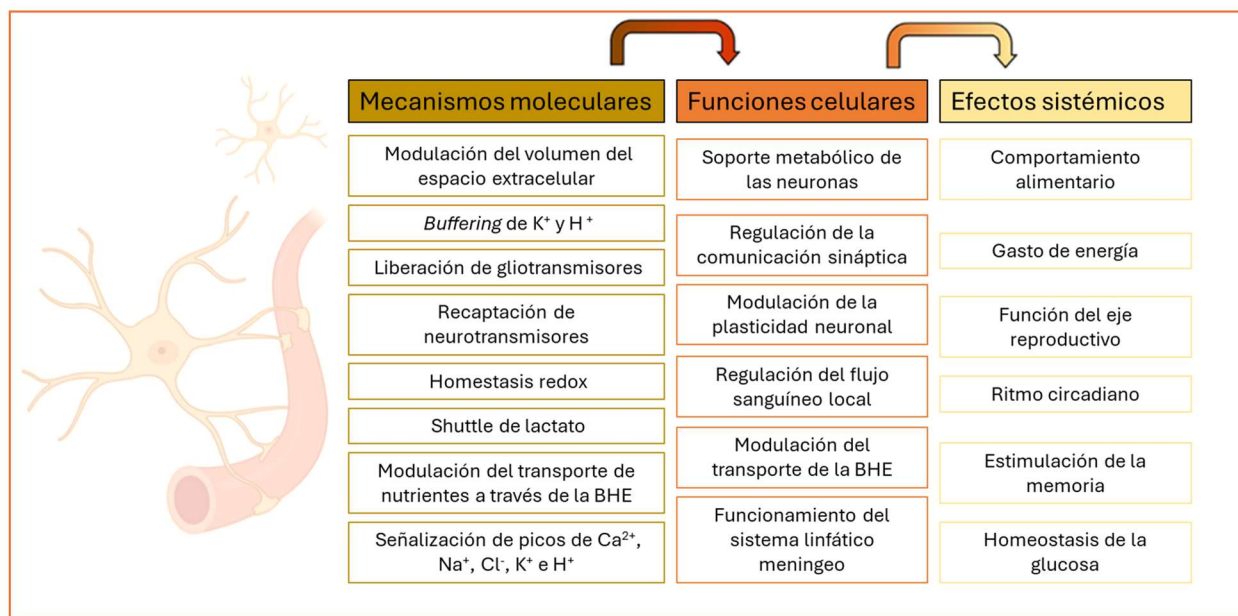


Figura 14. Rol metabólico integral de los astrocitos. Los astrocitos participan activamente en la homeostasis cerebral mediante funciones clave como el *shuttle* de lactato, la regulación sináptica, el equilibrio iónico y redox, y la liberación de gliotransmisores. Su ubicación estratégica junto a los vasos cerebrales les permite controlar el ingreso de nutrientes al parénquima. Estas funciones los posicionan como nodos centrales en la regulación metabólica del sistema nervioso, con impacto en la cognición, el metabolismo energético, los ritmos circadianos y la reproducción (imagen modificada de González-García et al., 2021).

De este modo, los astrocitos no solo aseguran el soporte estructural y metabólico de las neuronas, sino que participan activamente en la integración de la señal sináptica, en la defensa antioxidante y en la regulación del entorno vascular, consolidándose como elementos clave en la fisiología cerebral y en la respuesta a condiciones patológicas.

Importancia de los astrocitos en la unidad neurovascular

La elevada demanda energética del cerebro está estrechamente ligada a la función de los astrocitos, que se sitúan en la interfaz entre la circulación sanguínea y las neuronas y conforman, junto con otros tipos celulares, un complejo funcional denominado unidad neurovascular. El cerebro consume aproximadamente el 25 % de la energía corporal total, a pesar de representar solo el 2 % de la masa del organismo. Esta energía proviene casi en su totalidad de la glucosa circulante, que ingresa al parénquima a través de una densa red vascular (Magistretti & Allaman, 2015).

La regulación precisa del flujo sanguíneo cerebral en respuesta a la actividad neuronal es fundamental para mantener la homeostasis energética del cerebro. Este proceso depende de la coordinación entre los múltiples tipos celulares que integran la unidad neurovascular: neuronas, astrocitos, células endoteliales, pericitos y microglía (Fig. 15).

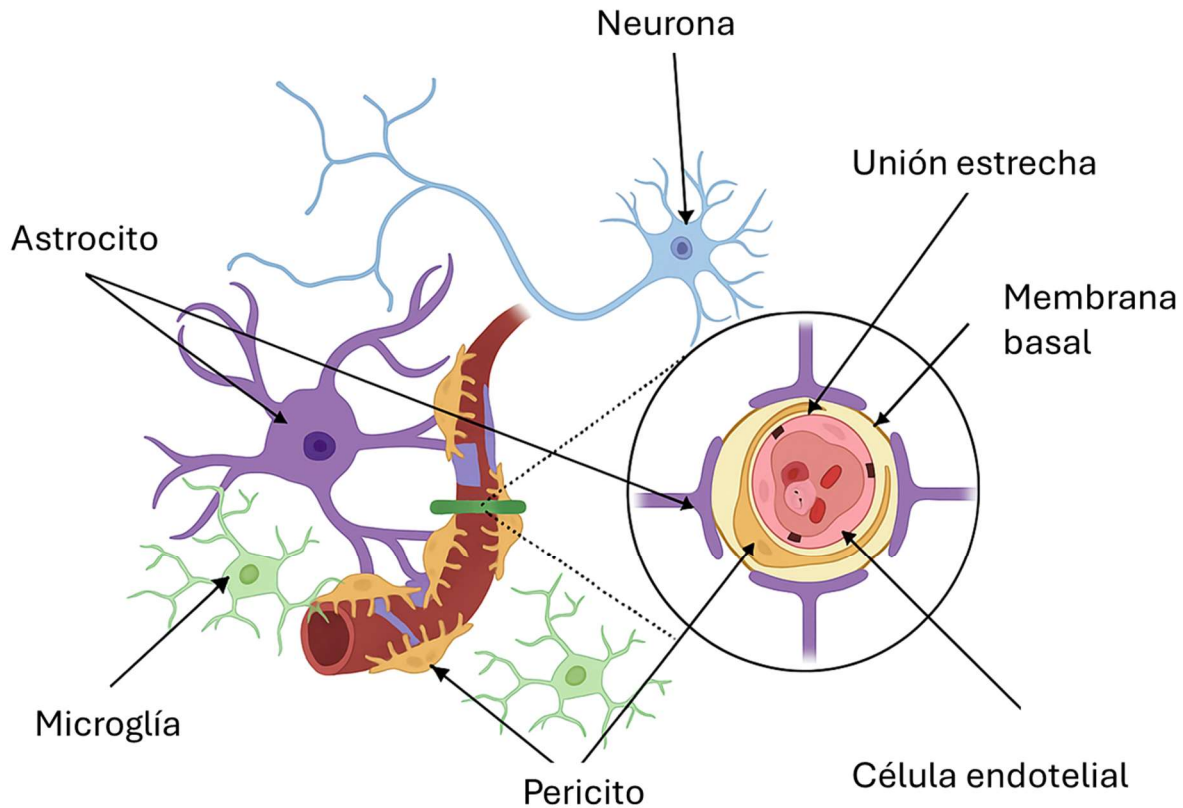


Figura 15. Esquema de la unidad neurovascular (UNV). La UNV está compuesta por neuronas, células vasculares (células endoteliales, pericitos), membrana basal y células gliales (astrocitos, microglía). Las neuronas establecen conexiones específicas con los vasos sanguíneos y con otras células de la UNV. Las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos están rodeadas por una membrana basal y unidas entre sí por proteínas de uniones estrechas (*tight junctions*). Ubicados en el parénquima cerebral, los astrocitos hacen contacto tanto con los pericitos como con las células endoteliales en la pared capilar, mientras que los pericitos se sitúan entre los pies terminales de los astrocitos y las células endoteliales (imagen modificada de Sato et al., 2022).

Dentro de este ensamblaje, los astrocitos desempeñan un papel clave como intermediarios entre la actividad neuronal y la respuesta vascular. Sus prolongaciones, denominadas *pies terminales*, envuelven la superficie de capilares y arteriolas, y participan activamente tanto en el mantenimiento de la BHE como en la señalización metabólica que ajusta el flujo sanguíneo a las demandas energéticas del tejido nervioso.

Los astrocitos detectan la actividad sináptica y liberan moléculas vasoactivas que modulan el tono vascular, en parte a través de vías que involucran la movilización del calcio intracelular y la síntesis de óxido nítrico. Así, actúan como elementos centrales en la integración de señales neuronales y vasculares, asegurando un aporte sanguíneo eficiente y acoplado al consumo energético cerebral (Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

Reserva energética astrocitaria: glucógeno y *shuttle* de lactato

Los astrocitos forman la principal reserva energética del sistema nervioso central mediante la síntesis y degradación de glucógeno astrocitario. A diferencia de las neuronas, que dependen casi exclusivamente del metabolismo oxidativo, los astrocitos pueden recurrir tanto a la fosforilación oxidativa como a la glucólisis para generar ATP. Aunque los gránulos de glucógeno cerebral son menos abundantes que en el hígado o en el músculo, resultan esenciales para sostener la actividad neuronal durante periodos de hipoglucemia o alta actividad sináptica: en hipoglucemia, la degradación de glucógeno astrocitario puede mantener la función neuronal por hasta 100 min; en isquemia global, sin embargo, esta reserva se agota en apenas 2 min (Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

El concepto de *shuttle* (lanzadera) de lactato astrocito-neurona, propuesto por Magistretti y Pellerin en los 90s, describe cómo el glutamato liberado en la sinapsis es captado por los astrocitos a través de transportadores EAAT1/2 (también llamado GLT-1) dependientes de Na^+ . El aumento de Na^+ citosólico se contrarresta mediante la bomba Na^+/K^+ , mientras que el glutamato se convierte en glutamina por acción de la glutamina sintetasa. Ambos procesos consumen ATP, lo que estimula la glucólisis y la captación de glucosa astrocitaria, incrementando la producción de lactato. Este lactato se exporta mediante los transportadores monocarboxilato MCT1 y MCT4 y es captado por las neuronas a través de MCT2, donde se transforma en piruvato y entra al ciclo de Krebs, rindiendo 14–17 moléculas de ATP por cada molécula de lactato (Barros, 2022). Así, los astrocitos no solo captan glucosa, sino que la reconvierten en lactato para reforzar el aporte energético a la neurona durante la actividad sináptica intensa o en condiciones de baja glucosa plasmática (Fig. 16).

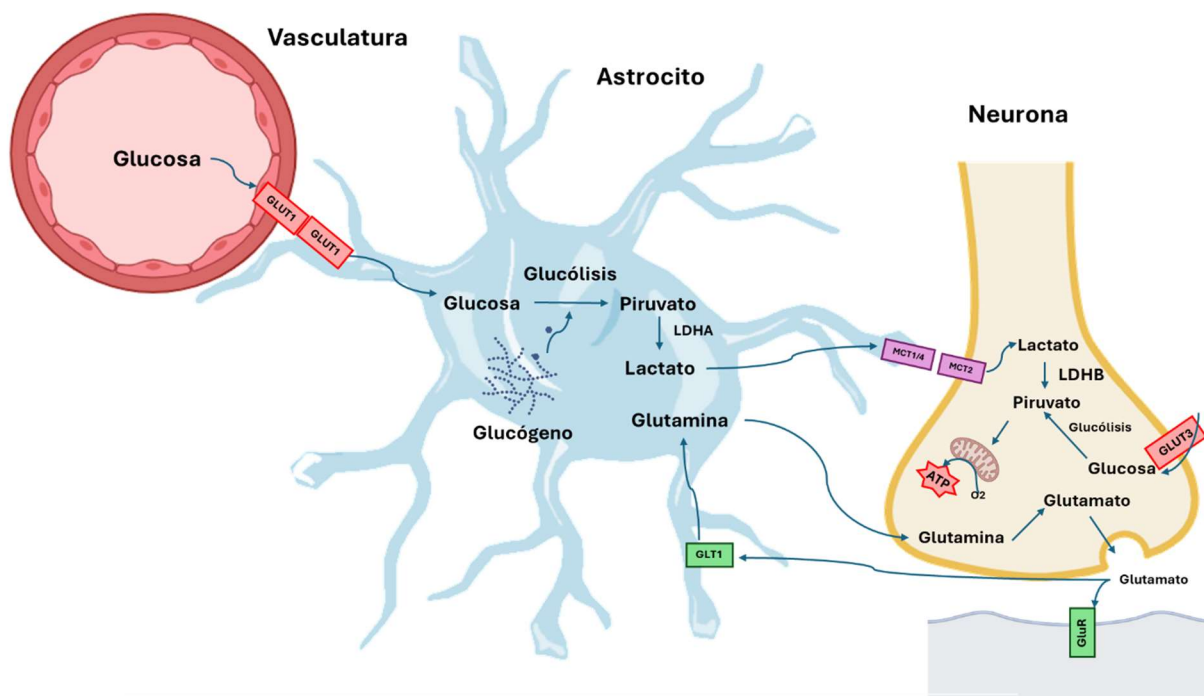


Figura 16. La hipótesis del *shuttle* de lactato astrocito-neurona. La activación de las neuronas conduce a la liberación del neurotransmisor glutamato. El glutamato es captado activamente por los astrocitos a través de los transportadores de glutamato (EAAT2/GLT-1) y convertido en glutamina. Esta captación de glutamato estimula tanto un aumento en la captación de glucosa desde los capilares circundantes mediante transportadores de glucosa (GLUT1) como un incremento de la glucólisis aeróbica. La glucólisis aeróbica también puede ser estimulada por la degradación de las reservas intracelulares de glucógeno. El piruvato es convertido en lactato por la isoenzima A de la lactato deshidrogenasa (LDHA) y exportado fuera de la célula por los transportadores de monocarboxilatos 1 o 4 (MCT1/4), siendo posteriormente transportado hacia el interior de las neuronas a través de MCT2. Dentro de las neuronas, la isoenzima B de la lactato deshidrogenasa (LDHB) convierte el lactato nuevamente en piruvato, que se utiliza como combustible para la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. La glucosa también puede ingresar directamente a las neuronas a través de los transportadores GLUT3 (imagen basada en Newington et al., 2013).

El rol central de los astrocitos en el suministro y en la redistribución de energía los convierte en agentes clave para la función cognitiva y la resiliencia neuronal. Cualquier alteración en estos mecanismos —ya sea por daño vascular, estrés oxidativo, inflamación o disfunción metabólica— impacta de manera directa en la actividad sináptica y la viabilidad neuronal. En este sentido, la

disfunción astrocitaria se ha asociado con trastornos neurodegenerativos, donde se observa una reducción del *shuttle* de lactato y del glucógeno, así como perturbaciones en la regulación vascular, exacerbando las deficiencias cognitivas (Verkhratsky & Nedergaard, 2018)

En resumen, los astrocitos no solo participan en la modulación sináptica y la defensa inmunológica, sino que también actúan como centinelas metabólicos, equilibrando la provisión de glucosa, la producción de lactato y la regulación del flujo sanguíneo. Su ubicación privilegiada y su capacidad para adaptarse dinámicamente a los cambios en la actividad neuronal subrayan su papel fundamental en la homeostasis energética cerebral, convirtiéndolos en un pilar indispensable para el funcionamiento óptimo del sistema nervioso central.

Implicaciones funcionales y patológicas de la relevancia astrocitaria

Desde un punto de vista metabólico, los astrocitos son esenciales para el manejo de lípidos y colesterol en el sistema nervioso central. Ante situaciones de estrés o daño neuronal -como en EA- los astrocitos incrementan la biogénesis de gotas lipídicas (LD) en el retículo endoplásmico, almacenando triacilglicéridos y ácidos grasos, atenuando así la lipotoxicidad y el estrés oxidativo (Smolič et al., 2021) (Fig. 17). Las LD funcionan como reservas energéticas: cuando la demanda de energía aumenta, las lipasas intracelulares hidrolizan sus triglicéridos, liberando ácidos grasos que son transportados a las mitocondrias para su β -oxidación. En el contexto de la EA, la acumulación excesiva de LD en astrocitos no solo refleja un mecanismo compensatorio para sostener el metabolismo cerebral, sino también un signo de desregulación lipídica que puede agravar la neurodegeneración (Yin, 2023).

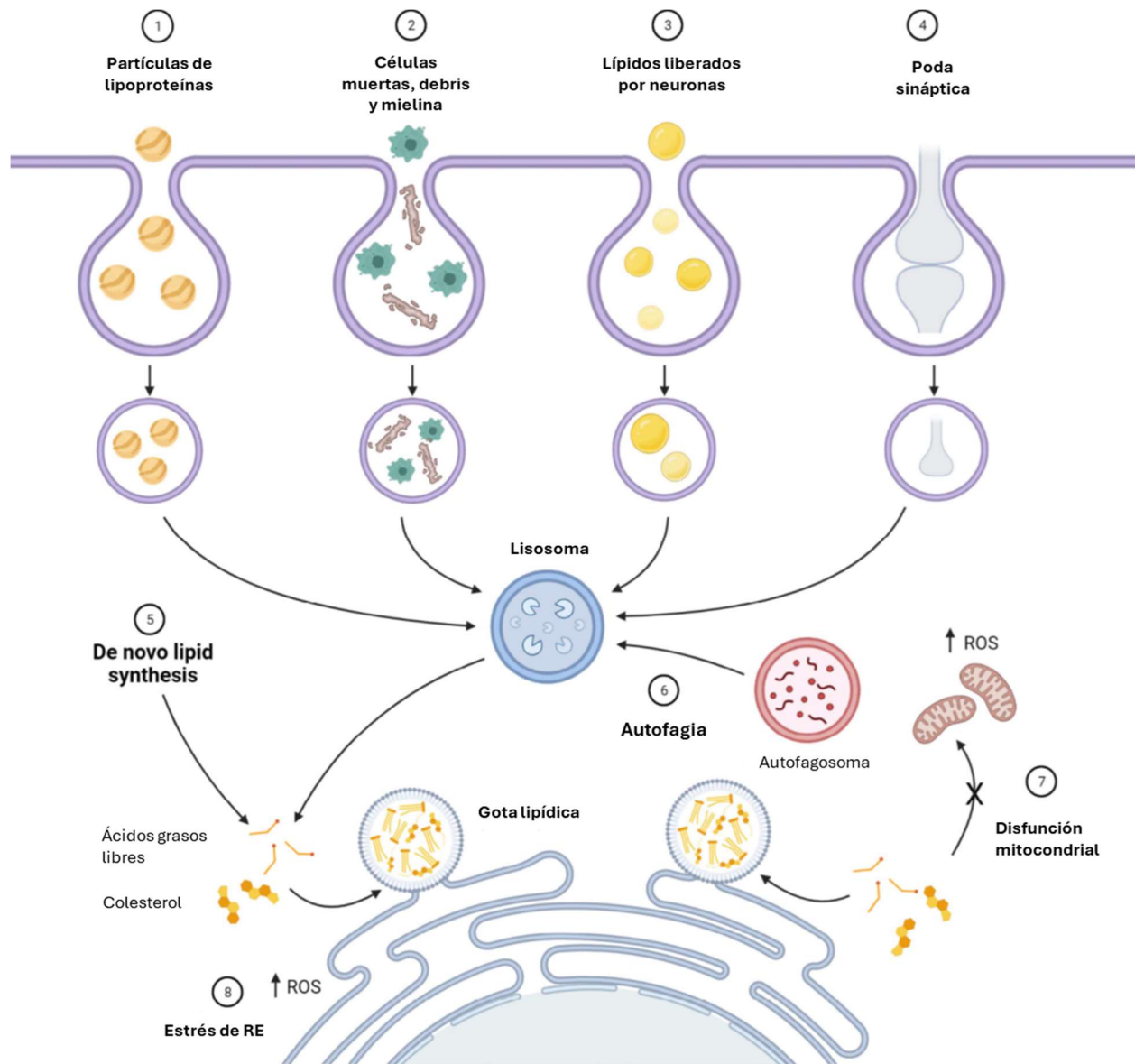


Figura 17. Formación de gotas lipídicas en el sistema nervioso. Esquema que resume los desencadenantes conocidos e hipotetizados de la formación de gotas lipídicas en las células del sistema nervioso. ROS, especies reactivas de oxígeno (Rahman et al., 2021).

Otro aspecto clave de la disfunción astrocitaria en la EA es la alteración en el reciclaje de neurotransmisores. En particular, la disminución de los transportadores EAAT2/GLT-1 y GLAST, responsables de la captación de glutamato, conduce a su acumulación en el espacio sináptico, exacerbando la excitotoxicidad. Este fenómeno puede ocurrir incluso en fases tempranas, donde los oligómeros de A β ya afectan la expresión de estos transportadores, alterando el equilibrio sináptico antes de la formación de placas visibles (Jacob et al., 2007; Mookherjee et al., 2011).

Introducción

Este conjunto de hallazgos consolida la idea de que los astrocitos no son simples acompañantes en la neurodegeneración, sino participantes activos en la progresión de la enfermedad de Alzheimer, a través de la regulación de la inflamación, el metabolismo lipídico y la homeostasis sináptica.

Inflamación crónica y reactividad astrogliol

La inflamación crónica constituye un eje patogénico clave en la EA. En etapas iniciales, la acumulación de A β y tau hiperfosforilada desencadena una respuesta inmune aguda, principalmente mediada por la microglía. Sin embargo, con el tiempo, esta respuesta se torna persistente y neurotóxica, favoreciendo la progresión del daño neuronal (Heneka et al., 2015). En este contexto inflamatorio sostenido, los astrocitos adquieren un fenotipo reactivo que no solo amplifica la respuesta inmunitaria, sino que también contribuye activamente a la disfunción sináptica y metabólica mediante la liberación de citoquinas, factores de crecimiento y gliotransmisores (Li & Haney, 2020). Este proceso, lejos de ser meramente pasivo, refleja la versatilidad funcional de estas células gliales como moduladoras del entorno cerebral (Fig. 18).

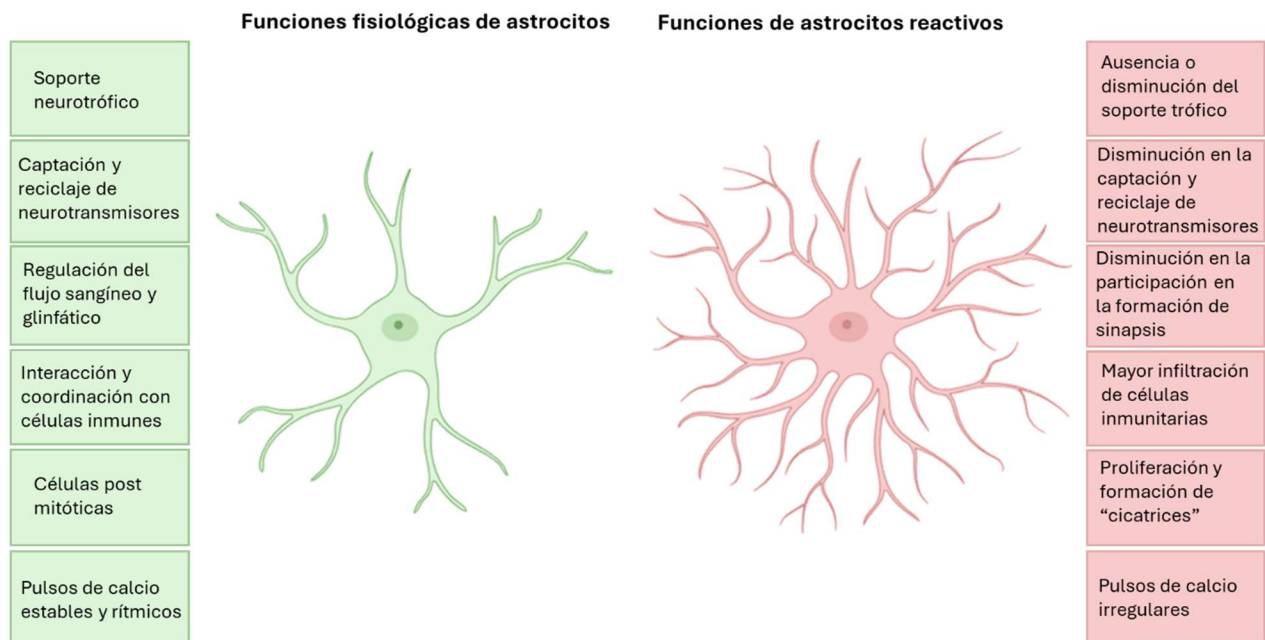


Figura 18. Funciones fisiológicas y reactivas de los astrocitos. El lado izquierdo (verde) muestra las funciones fisiológicas normales de los astrocitos, mientras que el lado derecho (rosa) muestra los cambios funcionales atribuidos a distintos estados de astrocitos reactivos. Cabe destacar que no

Introducción

todas las funciones pueden asignarse a un único astrocito, y que no todas las funciones fisiológicas se pierden en el contexto de la reactividad (Patani et al., 2023).

La comunicación con la microglía es central en este proceso. Las citoquinas proinflamatorias producidas por microglía—como IL-1 α , IL-1 β , TNF- α y C1q—estimulan y perpetúan la activación astrocitaria (Liddelow & Barres, 2017).

Entre los mediadores gliales involucrados, la proteína S100B adquiere especial relevancia. Si bien cumple funciones neurotróficas durante el desarrollo, su sobreexpresión en astrocitos reactivos se ha vinculado con mayor activación glial y depósito amiloide. Su inhibición farmacológica, por ejemplo, con pentamidina, ha demostrado reducir marcadores inflamatorios y ejercer efectos neuroprotectores, particularmente en regiones vulnerables como el hipocampo (Cirillo et al., 2015).

Objetivos e hipótesis

Objetivo general

Este estudio busca comprender cómo cambian los procesos metabólicos en el cerebro en el contexto de la enfermedad de Alzheimer (EA) experimental, poniendo especial atención en el papel de la glía en su regulación y su impacto en la neurodegeneración.

Partimos de la hipótesis de que, en las etapas tempranas de la EA, se produce un desbalance entre la energía que necesitan las neuronas y la disponibilidad de nutrientes esenciales para su funcionamiento. Este desajuste podría ser un factor clave en la atrofia y el deterioro neuronal, afectando principalmente regiones vulnerables como el hipocampo y la corteza.

Dado que los astrocitos desempeñan un papel central en la regulación del metabolismo cerebral—controlando el flujo sanguíneo, facilitando la captación de glucosa y asegurando el suministro de energía a las neuronas—este estudio se enfocará en analizar cómo cambia su función en el contexto de la enfermedad y cómo responden a distintas condiciones metabólicas. Con esto, buscamos aportar una visión más clara sobre los mecanismos que subyacen a la disfunción metabólica en la EA y su posible relación con la progresión de la enfermedad.

Se proponen los siguientes Objetivos Específicos:

Objetivo 1: Caracterización de los cambios metabólicos en ratones transgénicos PDAPP-J20, modelo de la EA

El primer objetivo de esta investigación fue caracterizar los cambios metabólicos presentes en el modelo murino de la EA, el ratón transgénico PDAPP-J20 a los 8 meses de edad. Para ello, consideramos la relación entre la patología de Alzheimer, la resistencia a la insulina y otros trastornos metabólicos, basándonos en la evidencia previa que indica alteraciones metabólicas en pacientes con esta enfermedad.

Partimos de la hipótesis de que, en el contexto de un modelo animal de la EA, existen cambios cerebrales de aparición temprana que preceden a la patología amiloide franca ocurriendo principalmente a nivel glial y afectando el estatus metabólico e inflamatorio cerebral con impacto sobre la función neuronal y la capacidad cognitiva.

Objetivos e hipótesis

Para abordar este objetivo, evaluamos distintos parámetros metabólicos, cerebrales y conductuales en los ratones del modelo PDAPP-J20. Además, con el propósito de contextualizar los cambios metabólicos observados, incluimos un modelo animal de resistencia a la insulina inducido mediante una dieta alta en grasas (HFD).

Dado que históricamente la mayoría de los estudios preclínicos en modelos animales de EA se han realizado exclusivamente en machos, y considerando que el riesgo y la progresión de la enfermedad de Alzheimer presentan diferencias importantes entre sexos, decidimos incluir tanto machos como hembras en los análisis realizados. Esta decisión responde a la necesidad actual de abordar el impacto del sexo como una variable biológica crítica, especialmente en el estudio de patologías multifactoriales como la EA, donde factores hormonales, metabólicos e inmunitarios pueden modular de forma diferencial la vulnerabilidad cerebral y la respuesta a las alteraciones metabólicas.

Objetivo 2: Análisis del perfil de activación y cambios en vías metabólicas en modelos *in vivo* e *in vitro* de la EA

El segundo objetivo de esta investigación fue estudiar el perfil de activación astrogliar, con especial énfasis en el fenotipo proinflamatorio, y los cambios en vías metabólicas asociados en modelos experimentales de la EA tanto *in vivo* como *in vitro*.

Nos basamos en la hipótesis de que la activación glial inducida por péptidos amiloides lleva a un fenotipo proinflamatorio con pérdida de funciones homeostáticas asociadas a la utilización de energía, promoviendo la neurodegeneración.

Para ello, empleamos el modelo murino PDAPP-J20 y un modelo *in vitro*, en los cuales evaluamos distintos marcadores relacionados con la activación celular y el metabolismo. Específicamente, analizamos proteínas y procesos clave, incluyendo la expresión de GFAP y S100B como indicadores de activación astrocitaria, NFκB como marcador de inflamación, y GLT-1 en relación con la regulación del transporte de glutamato. Además, estudiamos parámetros metabólicos como la producción de especies reactivas de oxígeno mediante MitoSOX, la señalización de la insulina a través de IR, pIR y pAKT, así como los niveles de glucógeno, la captación de glucosa y la degradación de gotas lipídicas.

Objetivos e hipótesis

Este enfoque permitió comprender con mayor profundidad los mecanismos inflamatorios y metabólicos involucrados en la progresión de la EA, así como su posible relación con la resistencia a la insulina y otros desbalances metabólicos.

Objetivo 3: Modulación funcional y mecanística de la insulina en el metabolismo energético de astrocitos expuestos a A β

El tercer objetivo de esta investigación fue evaluar cómo la insulina modula, tanto desde un punto de vista funcional como mecanístico, el metabolismo energético en astrocitos in vitro expuestos a A β , partiendo de la hipótesis de que esta hormona favorece un estado celular más homeostático al potenciar la respuesta de los astrocitos frente al A β y regular su metabolismo energético.

Buscamos comprender el impacto de la insulina en la regulación metabólica de estas células y su posible papel en la respuesta celular ante la acumulación de A β , un evento central en la fisiopatología de la EA.

Para ello, analizamos distintos parámetros metabólicos en presencia de insulina, incluyendo la captación de glucosa, la expresión del transportador de glucosa GLUT1 y la liberación de lactato, con el fin de evaluar el estado energético de los astrocitos. Además, empleamos MitoTracker para examinar la dinámica y funcionalidad mitocondrial en presencia de insulina. Finalmente, estudiamos la capacidad de los astrocitos para fagocitar A β en condiciones de estimulación con insulina, lo que permitió esclarecer el posible rol de esta hormona en la modulación de la respuesta celular ante la acumulación de péptidos tóxicos.

Este análisis contribuyó a una mejor comprensión de los mecanismos a través de los cuales la insulina regula el metabolismo energético de los astrocitos y su capacidad de respuesta frente a la patología amiloide, proporcionando información relevante sobre la relación entre resistencia a la insulina y EA.

Resultados

Resultados *in vivo*

Con el objetivo de caracterizar los cambios conductuales, metabólicos y periféricos presentes en la EA, analizamos los cambios patológicos presentes en un modelo animal de la patología. Por un lado, utilizamos ratones transgénicos (Tg) PDAPP-J20 adultos como modelo de la enfermedad y, por otro lado, alimentamos a un grupo de ratones no transgénicos (NTg) con una dieta alta en grasas (HFD), como un grupo control positivo de desarrollo de resistencia a insulina (Fig.19). En estudios previos reportamos que el modelo HFD de inicio en la adultez no se asocia a aumento de peso ni a hiperglucemia, pero presenta menor respuesta a la insulina y mayor insulinemia que los animales controles (Vinuesa et al., 2016, 2019).

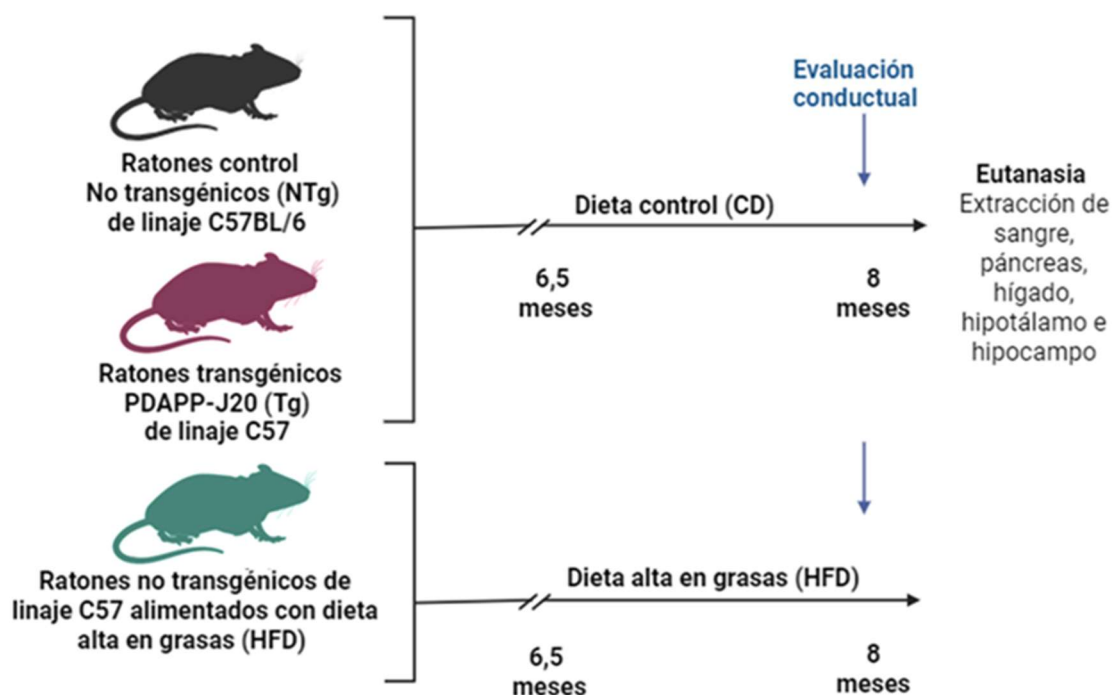


Figura 19. Diseño experimental *in vivo*. Se evaluaron parámetros metabólicos y conductuales en ratones transgénicos PDAPP-J20 (Tg), controles no transgénicos (NTg), y C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasas (HFD) durante 1,5 meses, machos y hembras, de 8 meses de edad.

En primer lugar, criamos a los ratones en sus respectivas jaulas divididos al momento del destete entre machos y hembras. El grupo de ratones HFD recibió un alimento con mayor porcentaje de las

calorías provenientes de las grasas (45% vs. 12% de la dieta control) desde los 6,5 meses de vida hasta los 8 meses, cuando finalizó el protocolo.

La elección de los 8 meses de edad para finalizar el protocolo y analizar los cambios metabólicos en los ratones PDAPP-J20 se fundamenta en dos criterios principales: evidencia previa de progresión patológica en este modelo y la lógica experimental derivada de la hipótesis planteada. En primer lugar, estudios previos han demostrado que en los ratones PDAPP-J20 la acumulación de placas de β -amiloide en el hipocampo y corteza comienza alrededor de los 5–6 meses (Dhapola et al., 2023) y se intensifica hacia los 8 meses, momento en el que la patología amiloide ya se encuentra establecida, aunque aún en un estadio relativamente temprano de la enfermedad (Gregosa et al., 2019). A esa edad también se ha documentado deterioro cognitivo y activación glial, lo que indica una fase activa del proceso neurodegenerativo, pero todavía susceptible de intervención. En segundo lugar, dado que nuestro objetivo fue caracterizar alteraciones metabólicas tempranas -particularmente aquellas vinculadas a la señalización de insulina y al metabolismo energético cerebral- optamos por esta ventana temporal en la que es posible detectar cambios funcionales sin que el daño neurodegenerativo sea aún irreversible. En este sentido, la elección de los 8 meses resulta estratégica para detectar sinergias o divergencias entre la patología neurodegenerativa y la disfunción metabólica sistémica.

Dado que el sexo biológico puede influir en el desarrollo de trastornos neurodegenerativos y en las respuestas metabólicas, utilizamos ratones tanto machos como hembras en nuestros experimentos. En particular, en la EA se han descrito diferencias sexo-específicas tanto en la carga de placas como en la reactividad glial y el deterioro cognitivo (J.-T. Yang et al., 2018). Además, el dimorfismo sexual también puede afectar la respuesta a factores de riesgo metabólicos para la EA como la obesidad, la resistencia a la insulina y la disfunción energética cerebral. Por lo tanto, la inclusión de animales de ambos sexos nos permitió obtener una caracterización más completa y representativa del fenotipo experimental.

Perfil conductual

Prueba de campo abierto

Con el fin de estudiar el estado cognitivo de los ratones Tg y los expuestos a una HFD, realizamos evaluaciones que abordan distintos aspectos de la conducta. Las pruebas fueron grabadas en video para su análisis posterior.

En primer lugar, realizamos la prueba de campo abierto (*OF* por las siglas en inglés de *open-field*). En esta prueba, el ratón puede explorar libremente el área de una caja abierta en su cara superior durante 5 minutos (Fig. 20).

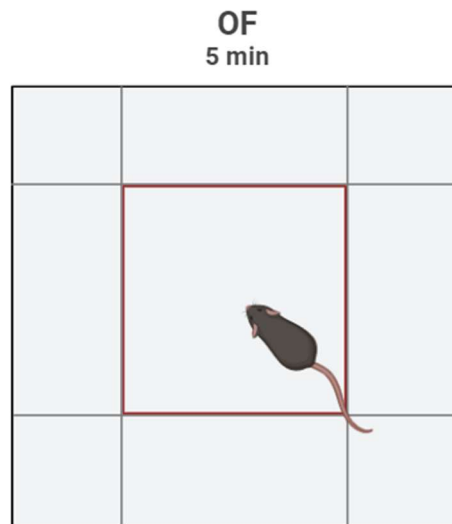


Figura 20. Esquema de la plataforma de la prueba de campo abierto (Open-Field, OF). Diseño experimental *in vivo*. La línea roja indica el límite entre las zonas periférica y central del dispositivo.

Debido a la naturaleza curiosa de la especie, es esperable que el ratón se mueva constantemente explorando toda la plataforma. Sin embargo, la superficie amplia, clara y luminosa es un factor estresor para el ratón, por lo que se espera que aquellos ratones que sufren de mayores niveles de ansiedad tienden a evitar cruzar por el centro de la plataforma y mantienen su trayectoria en la periferia, cercanos a la pared de la estructura. Si bien la ansiedad es una emoción subjetiva y, por lo tanto, imposible de confirmar en un ratón, esta prueba de conducta permite determinar patrones de comportamiento denominados de “tipo ansioso” que se encuentran presentes en modelos de inducción de estrés o miedo y responden a tratamientos ansiolíticos.

Mediante el uso de un software de análisis de conducta, medimos la trayectoria de los ratones diferenciando la distancia recorrida en el centro de la recorrida en la periferia.

Pudimos observar que, en comparación con el grupo control, tanto los ratones alimentados con la HFD como los Tg, tendieron a evitar recorrer el centro de la plataforma evidenciándose una disminución significativa del porcentaje de la distancia recorrida en el centro respecto a la distancia total (Fig. 21). Este fenotipo de tipo-ansioso se manifestó tanto en las hembras como en los machos Tg y HFD (Fig. 22).

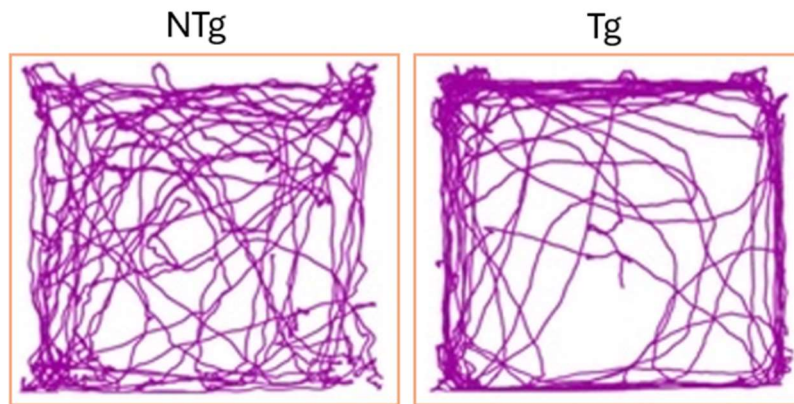


Figura 21. Trazado de trayectoria representativo de un ratón no transgénico (NTg, izquierda) y uno transgénico (Tg, derecha) en la prueba de campo abierto durante 5 minutos.

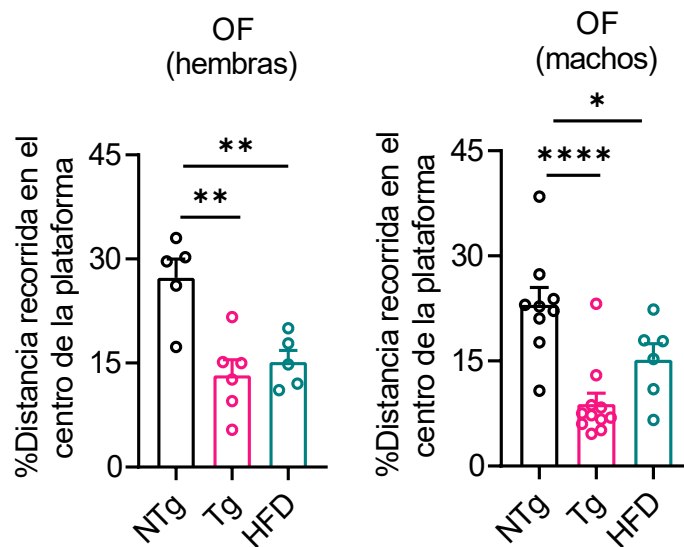


Figura 22. Porcentaje de la distancia recorrida en el centro de la plataforma en relación a la distancia total recorrida durante los 5 minutos de la prueba en hembras (ANOVA de una vía; test de

comparaciones múltiples de Dunnett; $^{**}p < 0,01$; $n = 5-6$) y machos (ANOVA de una vía; test de comparaciones múltiples de Dunnett; $^{*}p < 0,05$, $^{****}p < 0,0001$; $n = 6-11$).

Finalmente, evaluamos también la distancia total recorrida sin evidenciar diferencias entre los grupos, tanto de hembras como de machos (Fig. 23). Con este dato pudimos corroborar que la menor exploración del centro de la plataforma no se atribuyó a una menor trayectoria total.

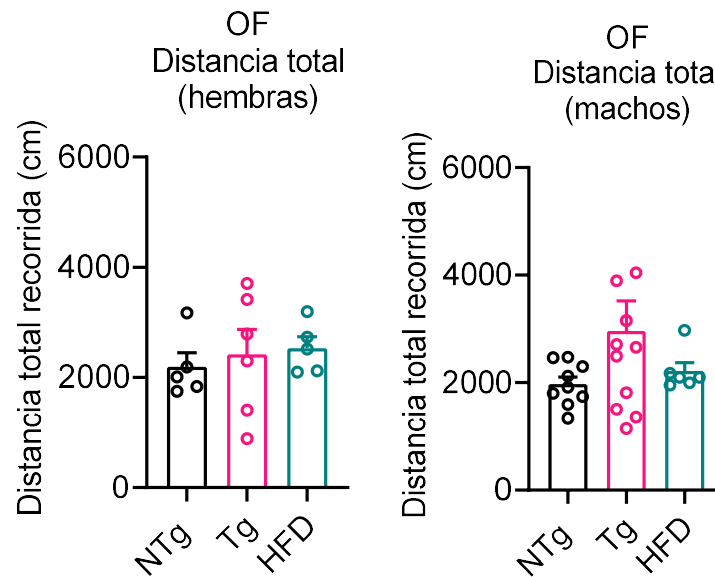


Figura 23. Distancia total recorrida en la plataforma recorrida durante 5 minutos en el campo abierto en hembras ($n = 5-6$) y machos ($n = 6-11$).

Laberinto de Barnes

Para la evaluación de la memoria espacial utilizamos el laberinto de Barnes. Esta es una prueba conductual que permite evaluar la memoria espacial y la capacidad de aprendizaje. Se basa en la capacidad del animal para recordar la ubicación de una “salida segura” en una plataforma circular con múltiples orificios circulares (Fig. 24).

La plataforma es amplia, blanca, elevada 70 cm del suelo y se encuentra uniformemente iluminada. Estos factores resultan levemente estresantes para el ratón, por lo que, si bien los animales tenderán naturalmente a explorar la superficie del dispositivo, también optarán por una salida segura en el caso de encontrarla. La salida segura consta de un orificio “*target*” que conduce a una caja oscura por debajo de la plataforma.

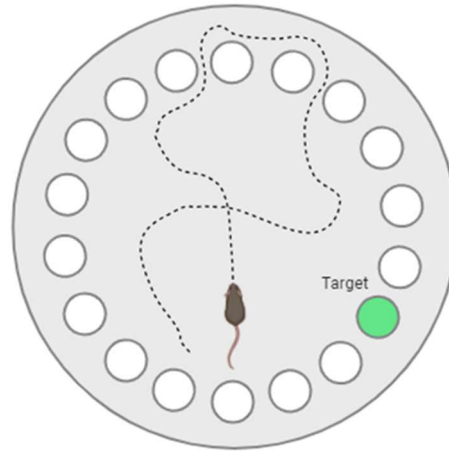
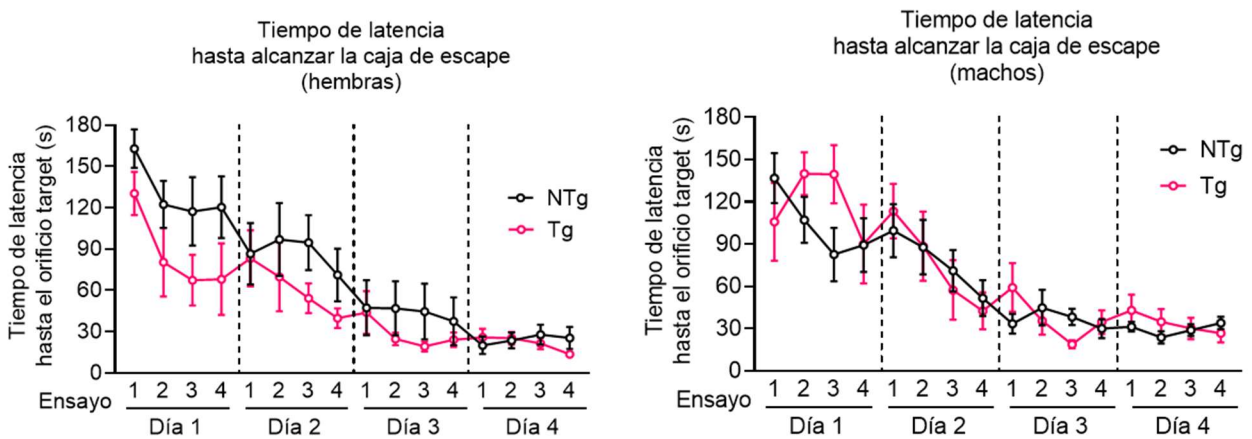


Figura 24. Esquema representativo de la plataforma de la prueba Barnes.

Una vez finalizada la prueba, cuantificamos el tiempo que los ratones tardaron en localizar el orificio *target* (ambas fases) e ingresar a la caja negra (fase de aprendizaje) (Fig. 25).



Durante la fase de entrenamiento en el laberinto de Barnes, no se observaron diferencias significativas en la curva de aprendizaje entre los genotipos, tanto en machos como en hembras, evaluada a partir de la latencia para encontrar el orificio objetivo a lo largo de los primeros cuatro días de ensayo. Este hallazgo sugiere que, en este período, ambos grupos fueron capaces de aprender la tarea de forma comparable.

Sin embargo, el ensayo de prueba realizado el día 5, que evalúa la memoria espacial de largo plazo, reveló un deterioro significativo en el rendimiento de los ratones Tg en comparación con sus controles NTg. En esta fase, los animales Tg presentaron una mayor latencia (Fig. 26) y distancia recorrida (Fig. 27) para alcanzar el objetivo, tanto en machos como en hembras.

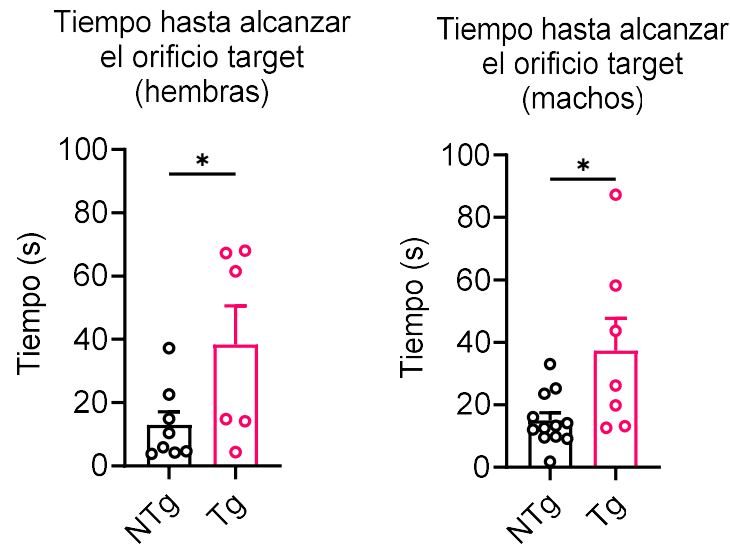


Figura 26. Tiempo (en segundos) hasta alcanzar el orificio *target* (prueba t de Student bilateral; *p < 0,05; n = 6-12).

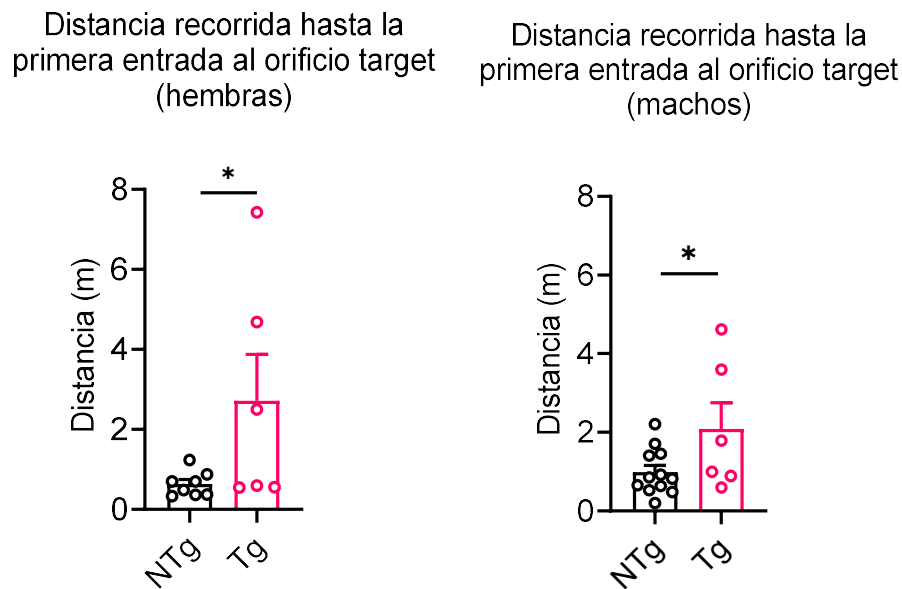


Figura 27. Distancia recorrida en metros hasta alcanzar el orificio *target* en ratones hembra y machos (prueba t de Student bilateral; *p < 0,05) (n = 6-8).

Esta diferencia entre genotipos es a su vez notoria cualitativamente al observar el esquema de la trayectoria recorrida hasta encontrar el orificio *target* (Fig. 28), evidenciando trayectorias menos eficientes en los ratones Tg.

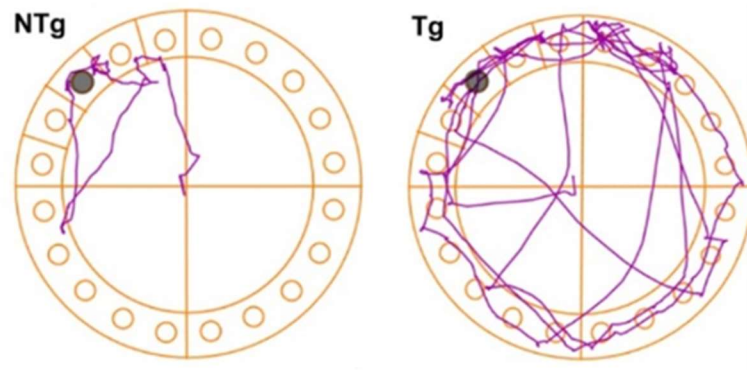


Figura 28. Trayectorias representativas de los recorridos en la prueba de memoria del laberinto de Barnes (día 5; durante un seguimiento de 90 segundos).

Estos resultados indican que, a pesar de haber aprendido inicialmente la tarea, los ratones Tg mostraron una menor retención de la memoria espacial a largo plazo, lo cual representa un déficit cognitivo característico en modelos de la EA.

Perfil metabólico

Consumo de alimento y peso corporal

Con el objetivo de caracterizar los cambios metabólicos presentes en nuestro modelo animal de la patología, y considerando los puntos en común entre las enfermedades neurodegenerativas y los trastornos metabólicos, analizamos distintos parámetros metabólicos en los ratones.

Durante 5 semanas registramos la cantidad de alimento que consumía cada jaula y lo relativizamos al consumo individual de cada ratón (Fig. 29), encontrando un consumo similar entre los ratones alimentados con la dieta control (CD) y los alimentados con la HFD.

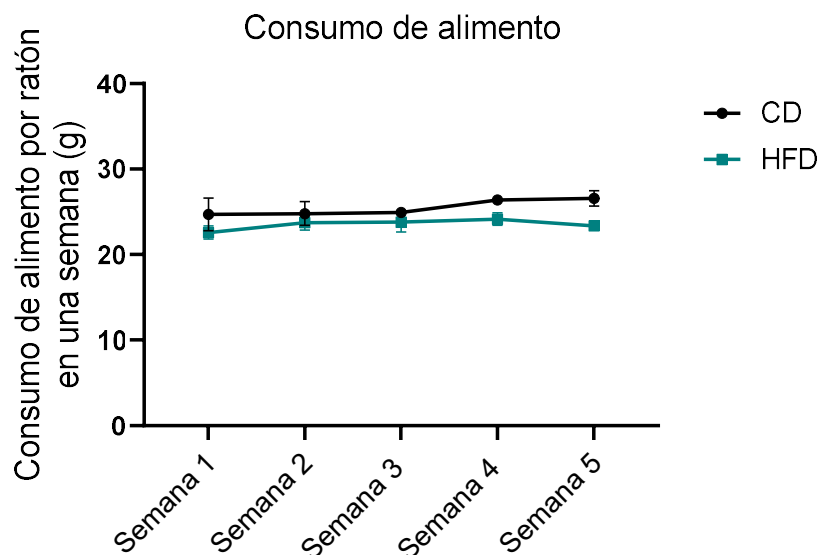


Figura 29. Consumo de alimento por ratón en gramos a lo largo de una semana medido durante 5 semanas en el grupo control (CD) y el grupo de dieta alta en grasa (HFD). n = 2-8 (el n corresponde al promedio de consumo por ratón para cada jaula).

Al cuantificar la cantidad de calorías consumidas por ambos grupos, comprobamos que el grupo HFD consumió significativamente más calorías que los controles en todos los puntos temporales medidos, dado por el mayor aporte calórico de la dieta (Fig. 30).

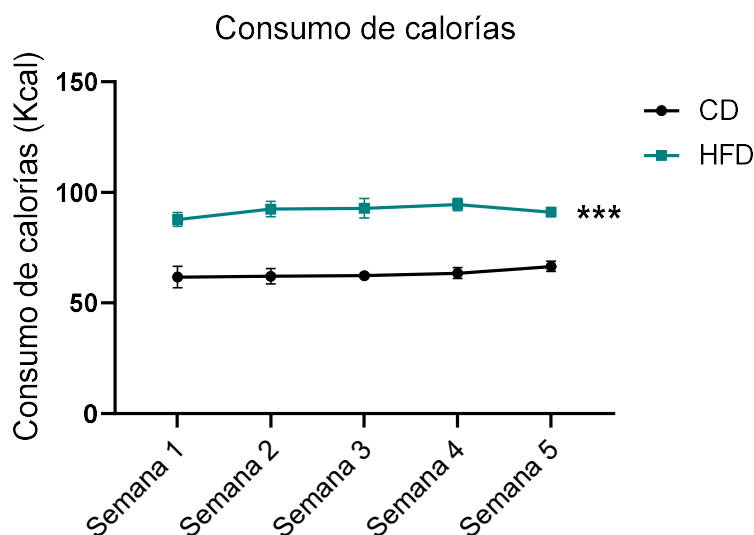


Figura 30. Consumo de calorías por ratón en calorías a lo largo de una semana medido durante 5 semanas en el grupo control y el grupo HFD (ANOVA de dos vías; ***p < 0,001). n = 2-8 (el n corresponde al promedio de consumo por ratón para cada jaula).

Luego, pesamos a los animales al momento de iniciar el protocolo (6,5 meses) y una vez más previamente a la eutanasia con el fin de determinar si había diferencias en la ganancia de peso a lo largo del tiempo debida al genotipo o al tipo de dieta. Expresamos el cambio del peso corporal como el peso final relativizado al peso inicial de cada ratón a los 6,5 meses, comparando los grupos NTg, Tg y HFD. No encontramos diferencias en el peso corporal relativo entre los ratones no transgénicos y transgénicos (Fig. 31), tanto en los grupos de hembras como de machos. Los ratones alimentados con la dieta HFD mostraron un aumento significativo del peso corporal solamente en el caso de los machos.

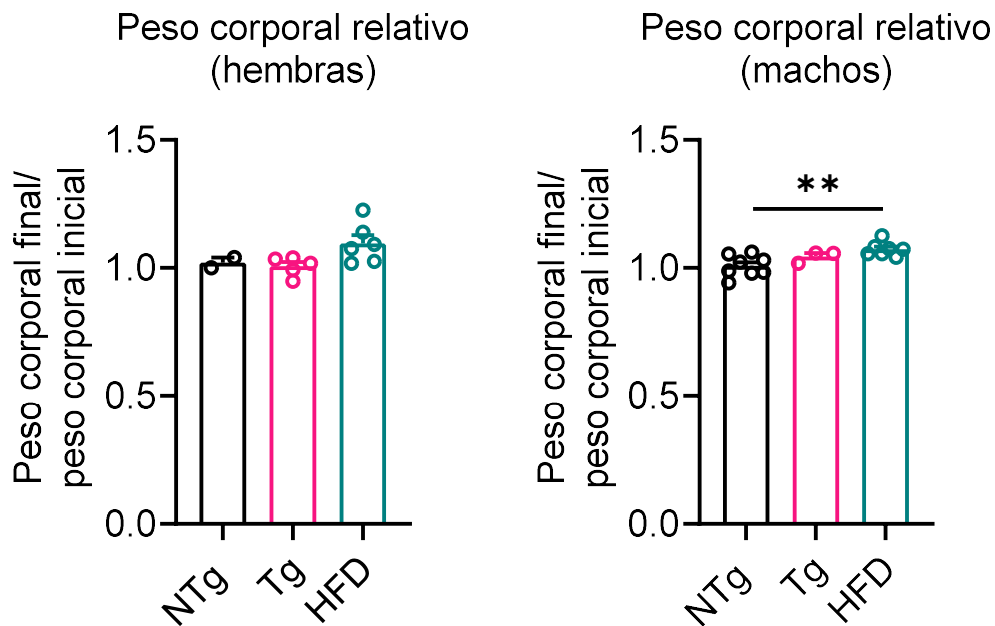


Figura 31. Peso corporal individual relativo medido como el cociente entre el peso al finalizar el protocolo (8 meses de edad) y el peso inicial (6,5 meses) de hembras (ANOVA de una vía; test de comparaciones múltiples de Dunnett; $p = 0,236$; $n = 2-6$) y machos (ANOVA de una vía; test de comparaciones múltiples de Dunnett; $**p < 0,01$; $n = 3-8$).

Glucemia al destete y al final del protocolo

Con el objetivo de detectar posibles cambios metabólicos tempranos asociados al modelo transgénico, medimos la glucemia de los ratones al momento del destete a partir de una gota de

sangre de la cola utilizando un glucómetro. Observamos que los ratones no presentaron diferencias debidas al genotipo, siendo este el caso tanto para hembras como para machos (Fig. 32).

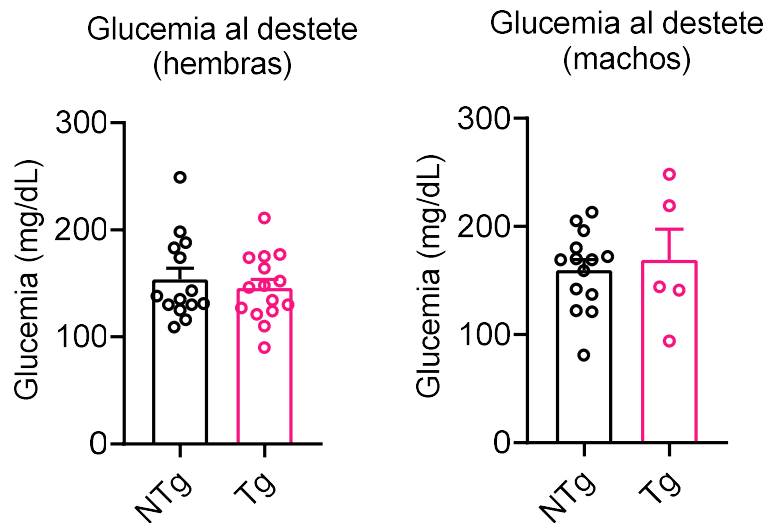


Figura 32. Glucemia medida en mg/dL utilizando un glucómetro en el momento del destete (21 días de edad; hembras: n = 14-15; machos: n = 5-14).

Una vez cumplidos los 8 meses de edad, determinamos la glucemia previamente a la eutanasia. Los niveles de glucemia no fueron significativamente diferentes entre los grupos NTg y Tg (Fig. 33). Además, el consumo de la HFD no produjo alteraciones significativas en los niveles de glucosa en sangre, corroborando experiencias previas (Vinuesa et al., 2016).

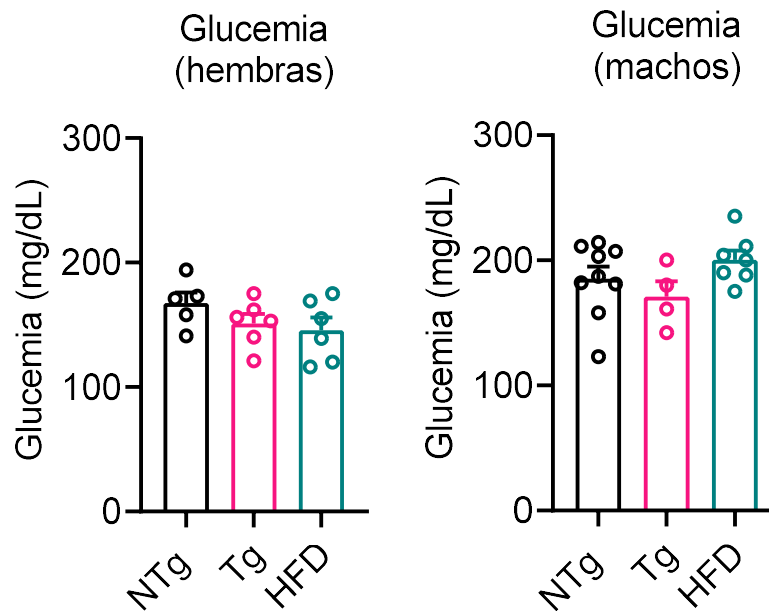


Figura 33. Glucemia medida en mg/dL utilizando un glucómetro previamente a la eutanasia (8 meses de edad) en hembras (n = 5-6) y machos (n = 4-9).

Insulinemia y HOMA-IR

Luego de haber medido la glucemia, anestesiarnos a los animales y realizamos una pequeña extracción de sangre perforando el seno venoso maxilar. Posteriormente, inyectamos intraperitonealmente a los animales con insulina con el fin de activar esta vía de señalización a nivel general. Transcurridos 10 minutos, realizamos la eutanasia por decapitación y seguidamente colectamos la sangre troncal.

A partir del suero del seno venoso maxilar realizamos un radioinmunoensayo (RIA) para cuantificar los niveles de insulinemia y no observamos diferencias significativas entre grupos experimentales (Fig. 34) aunque fue posible detectar una tendencia al aumento en los ratones macho alimentados con HFD con respecto a los controles ($p = 0,068$).

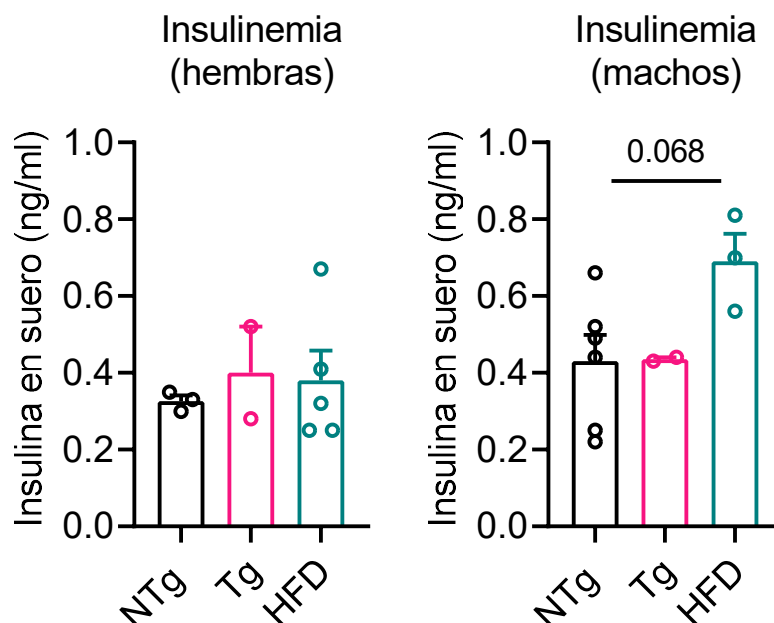


Figura 34. Insulinemia medida en ng/mL mediante radioinmunoensayo (RIA) a partir de sangre del seno venoso maxilar extraída previamente a la eutanasia (8 meses de edad) en hembras (n=2-5) y machos (ANOVA de una vía; test de comparaciones múltiples de Dunnett; $p = 0,068$; $n = 2-6$ ratones por grupo).

Cabe destacar que la extracción de la sangre del seno venoso maxilar permite obtener un bajo volumen de sangre sin hacer peligrar la vida del animal. Por lo tanto, el número de muestras que alcanzaron el volumen necesario para realizar un RIA fue reducido. Por otro lado, colectamos muestras provenientes de la sangre troncal de volumen mucho mayor, y repetimos el análisis por RIA de forma de lograr un mayor número de réplicas.

Consideramos que, aunque en esta medición interviene un factor exógeno (la insulina inyectada), dicho factor es controlado, ya que la insulina se administra en cantidades equivalentes en todos los grupos experimentales, lo que hace que los resultados obtenidos permitan la comparabilidad entre los grupos.

El análisis de la insulinemia a partir de sangre troncal evidenció mayores niveles en los Tg que en los NTg. En el grupo HFD detectamos insulinemias más altas que en los controles, comprobando el trastorno metabólico en este modelo utilizado como control positivo de resistencia a la insulina. Los niveles de insulina en suero a partir de sangre troncal fueron más elevados que los encontrados en el seno venoso maxilar, probablemente debido a la inyección de insulina (Fig 35).

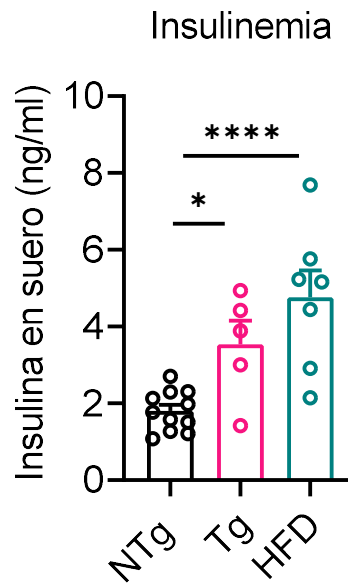


Figura 35. Insulinemia medida en ng/mL mediante radioinmunoensayo (RIA) a partir de sangre troncal extraída posteriormente a la eutanasia (8 meses de edad) (ANOVA de una vía; test de comparaciones múltiples de Dunnett; * $p < 0,05$; **** $p < 0,001$; machos y hembras; $n = 5-11$ ratones por grupo).

A partir de los datos de glucemia e insulinemia a punto final, calculamos el índice de resistencia a la insulina (*Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance*, HOMA-IR) el cual aumenta ante la pérdida de la sensibilidad a la insulina (Fig. 36). Pudimos comprobar un aumento en el índice en el modelo HFD con respecto a los ratones controles. En los ratones Tg detectamos una tendencia al aumento en el HOMA-IR ($p = 0,092$) con respecto a los controles.

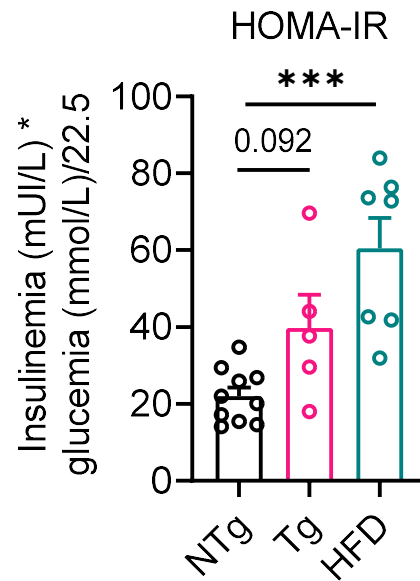


Figura 36. Índice de resistencia a la insulina (Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance, HOMA-IR) (ANOVA de una vía; test de comparaciones múltiples de Dunnett; NTg vs Tg: $p = 0.092$; NTg vs HFD: $***p < 0.001$; $n = 5-10$).

Inflamación pancreática

Dada la alteración en los niveles periféricos de insulina en los ratones Tg y HFD, nos propusimos evaluar si la hiperfunción pancreática endócrina podía estar relacionada con un estado inflamatorio del órgano.

En este sentido, evaluamos marcadores inflamatorios clave en el páncreas, específicamente IL-1 β (Fig. 37A) y COX-2 (Fig. 37B), factores asociados con procesos proinflamatorios y disfunción en la secreción de insulina. Aunque no detectamos diferencias significativas en los niveles de IL-1 β o COX-2 entre los grupos, observamos una tendencia hacia un aumento, especialmente en COX-2 en los ratones TG y HFD.

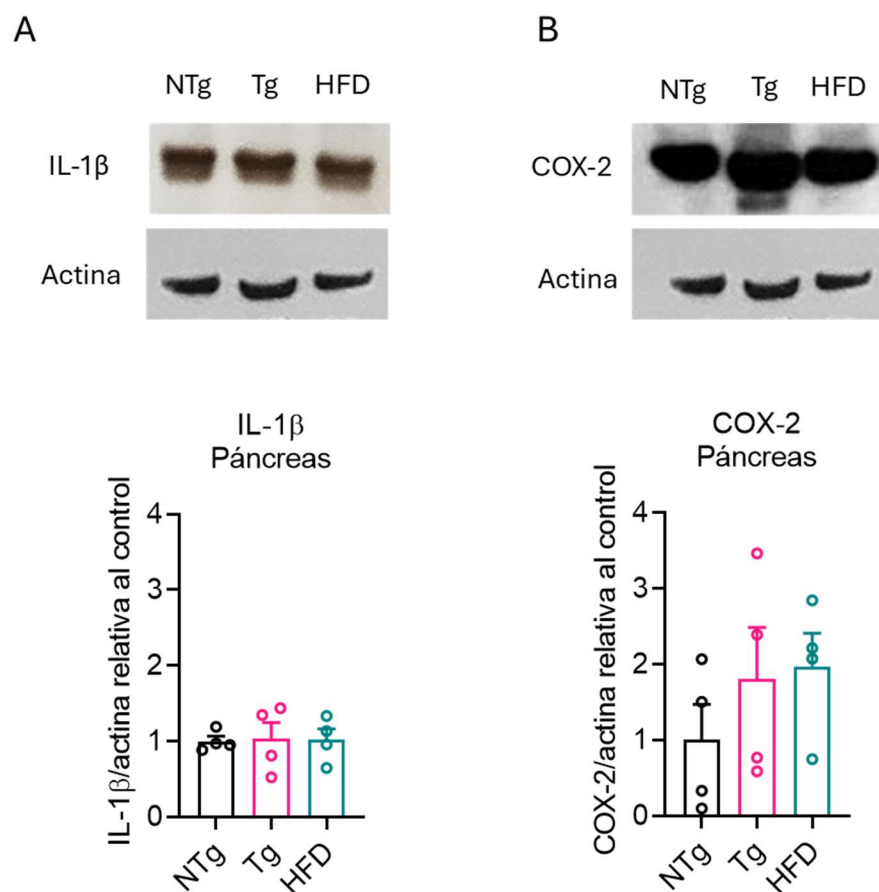


Figura 37. Ensayo de inmunoblot en extractos de proteínas del páncreas de ratones macho para IL-1 β (A) y para COX-2 (B) relativo a actina. n = 4.

Por lo tanto, podemos decir que la hiperfunción pancreática posiblemente asociada a la hiperinsulinemia observada en los ratones transgénicos no se acompañó, al menos en esta etapa de la patología, de una respuesta inflamatoria local.

Este hallazgo, asociado a una tendencia al aumento del índice HOMA-IR refuerza la hipótesis de una interacción bidireccional entre la EA y el metabolismo periférico.

Señalización sistémica y central de la insulina

Con el fin de determinar si la señalización de insulina se encontraba alterada, evaluamos los niveles de fosforilación de Akt en S473 (una de las fosforilaciones activadoras de Akt) en el hipotálamo (Fig. 38A) y en el hígado (Fig. 38B) tras la administración de insulina. Reportamos los resultados como la relativización a los niveles totales de la proteína Akt para cada muestra y no observamos diferencias significativas entre genotipos en ninguno de estos tejidos.

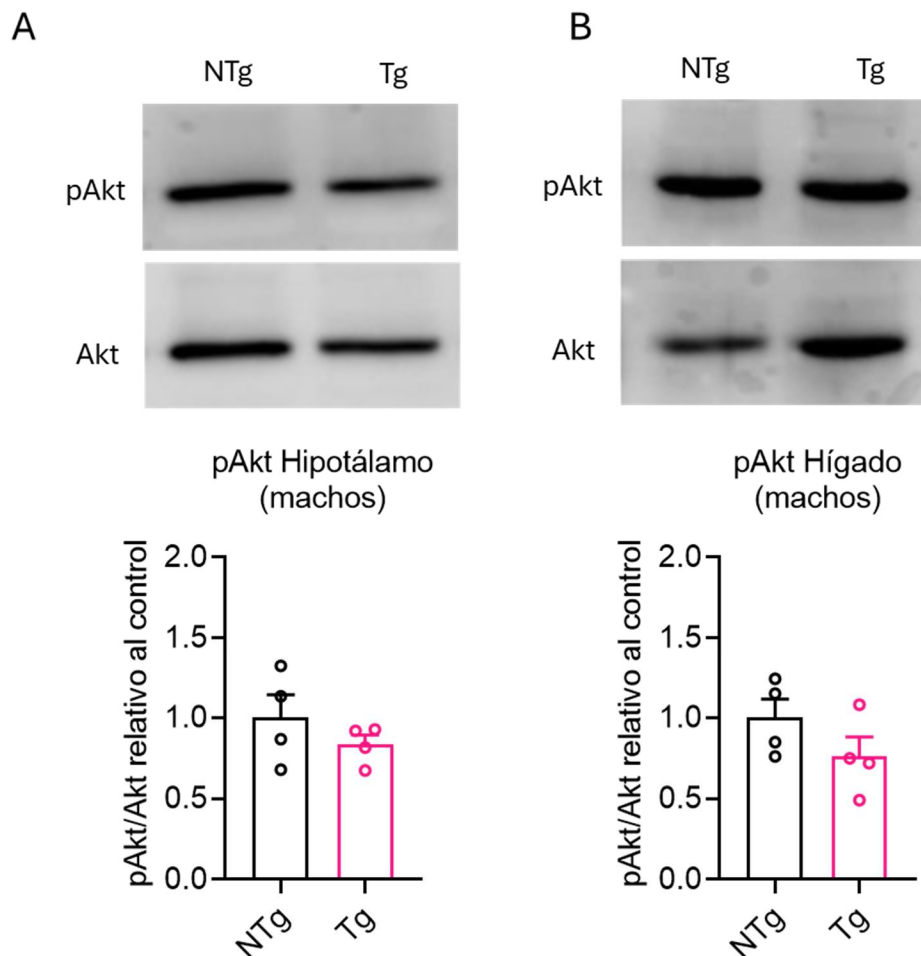


Figura 38. Ensayos de inmunoblot para pAkt/Akt en extractos de proteínas del hipotálamo (A) y de hígado (B) de ratones macho. n = 4 ratones por grupo.

Por otro lado, evaluamos los niveles de fosforilación de Akt tanto en hembras como en machos en el hipocampo (Fig. 39). Observamos una menor fosforilación de Akt en los Tg machos con respecto a sus controles, sugiriendo una alteración en la señalización de la insulina. En el caso de las hembras, no encontramos diferencias en la fosforilación de Akt entre Tg y controles.

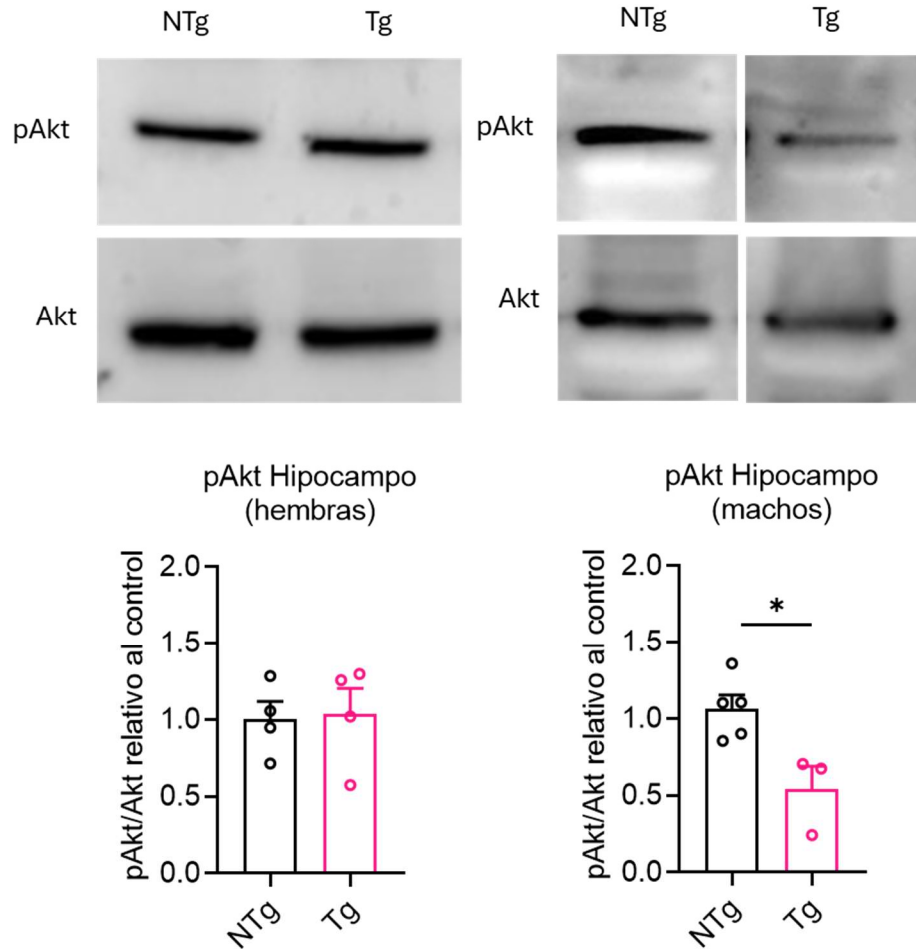


Figura 39. Ensayos de inmunoblot para pAkt/Akt en extractos de proteínas del hipocampo de ratones hembras y machos (prueba t de Student bilateral; $p < 0,05$). $n = 3-5$ ratones por grupo.

Luego, para comprender mejor este resultado, buscamos analizar los niveles de receptor de insulina (IR) en el hipocampo, ya que la hiperinsulinemia sostenida puede regular a la baja su expresión (Schwartz et al., 1990).

Encontramos que, a pesar de no demostrar déficits en la fosforilación de Akt en el hipocampo, las hembras Tg presentaron una tendencia hacia menores niveles del IR en esta estructura cerebral medida por western blot con respecto a los controles ($p = 0,056$; Fig.40).

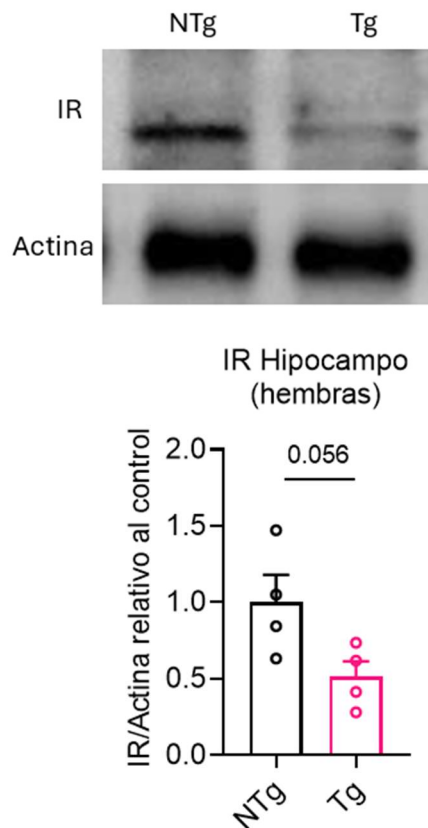


Figura 40. Ensayo de inmunoblot para IR/actina en extractos de proteínas del hipocampo de ratones hembra (prueba t de Student bilateral; $p = 0,056$). $n = 4$ ratones por grupo.

Luego, con el fin de evaluar si la disminución en los niveles del IR en el hipocampo podría estar asociada a una pérdida del receptor en astrocitos, realizamos una doble inmunofluorescencia para GFAP e IR en cortes coronales de hipocampo (Fig. 41). El análisis mostró que los astrocitos de los ratones transgénicos tenían menor presencia de receptores evidenciada por una menor colocación de puntos IR+ por célula GFAP+ con respecto a los astrocitos de los controles. Esta disminución de receptores de insulina en astrocitos fue significativa tanto en hembras como en machos (Fig. 42).

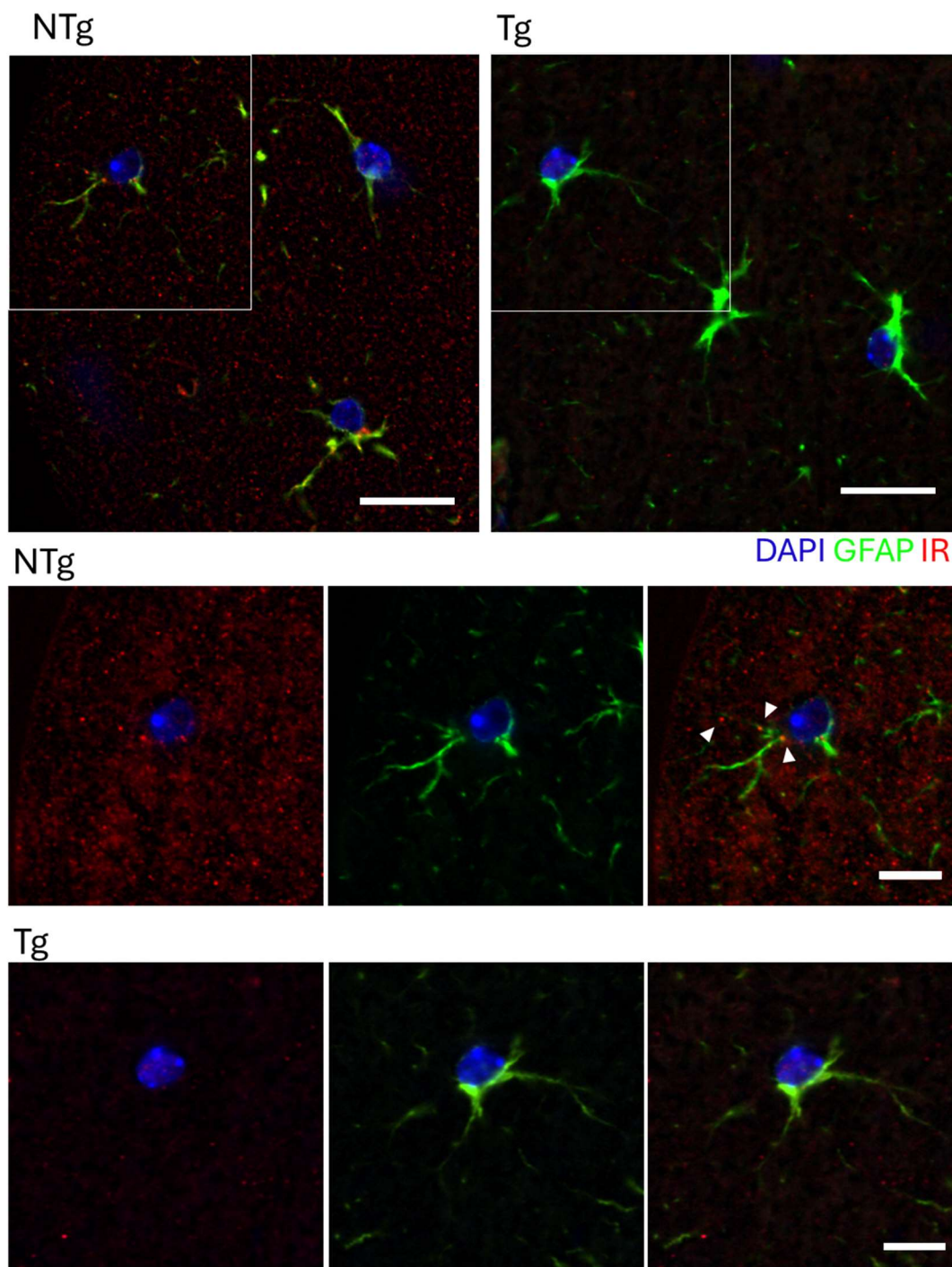


Figura 41. A. Inmunofluorescencia para IR (rojo), GFAP (verde) y DAPI (azul) en cortes hipocámpales de ratones NTg. Barra de escala = 20 μm. **B.** Magnificación de una célula de las imágenes de A. Barra de escala = 10 μm.

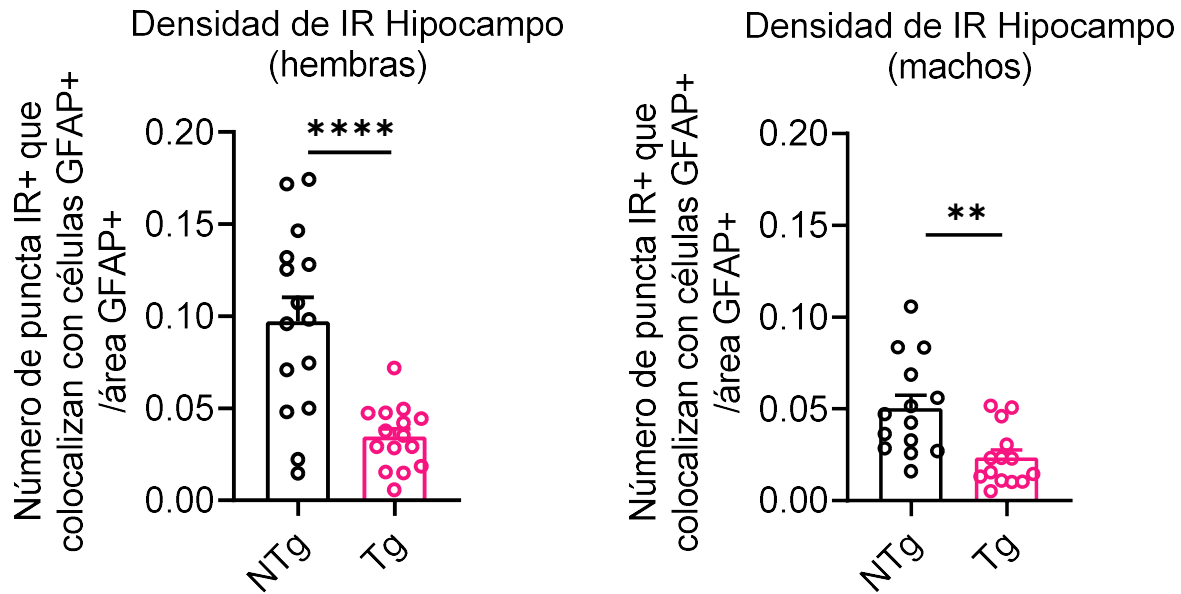
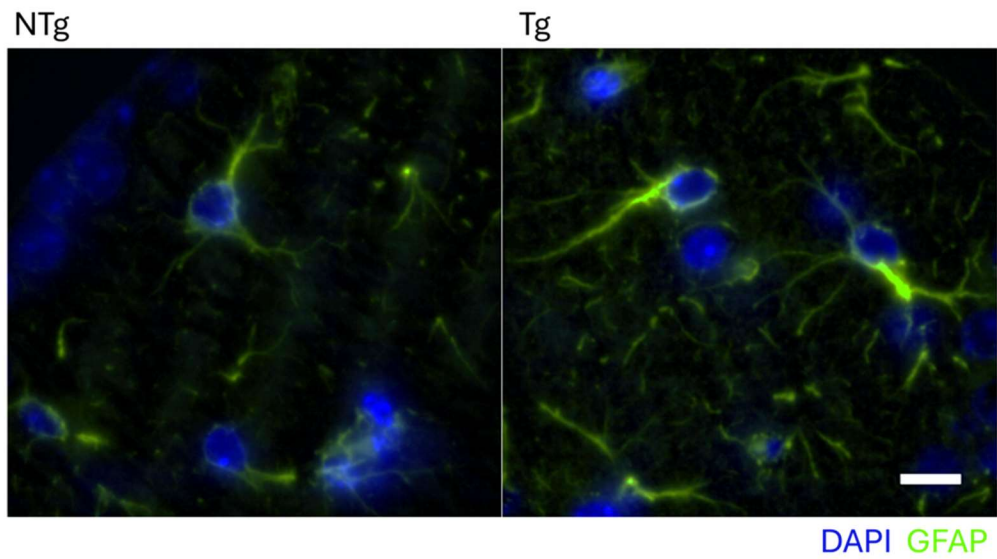


Figura 42. Cuantificación del número de puntos IR+ que colocalizaron con la marca inmunorreactiva de GFAP por célula en el hipocampo de hembras (izquierda) y de machos (derecha; prueba t de Student bilateral; **p < 0.01; ****p < 0,001; n = 15). El n corresponde al valor promedio de las células presentes en un campo.

Reactividad astrogliar en el hipocampo

Posteriormente abordamos la reactividad astrogliar del hipocampo con el fin de comprender si los cambios metabólicos en esta estructura cerebral se encontraban acompañados por activación astrogliar. Para esto, realizamos la medición del área inmunorreactiva de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP por sus siglas en inglés), marcador de astrocitos, en imágenes de microscopía confocal de cortes coronales cerebrales procesados para inmunofluorescencia. Comprobamos que tanto en machos como en hembras (Fig. 43) los ratones transgénicos presentaron un aumento significativo del área de GFAP en los astrocitos hipocampales, lo cual indicaría un estado astrocítico reactivo.

A



B

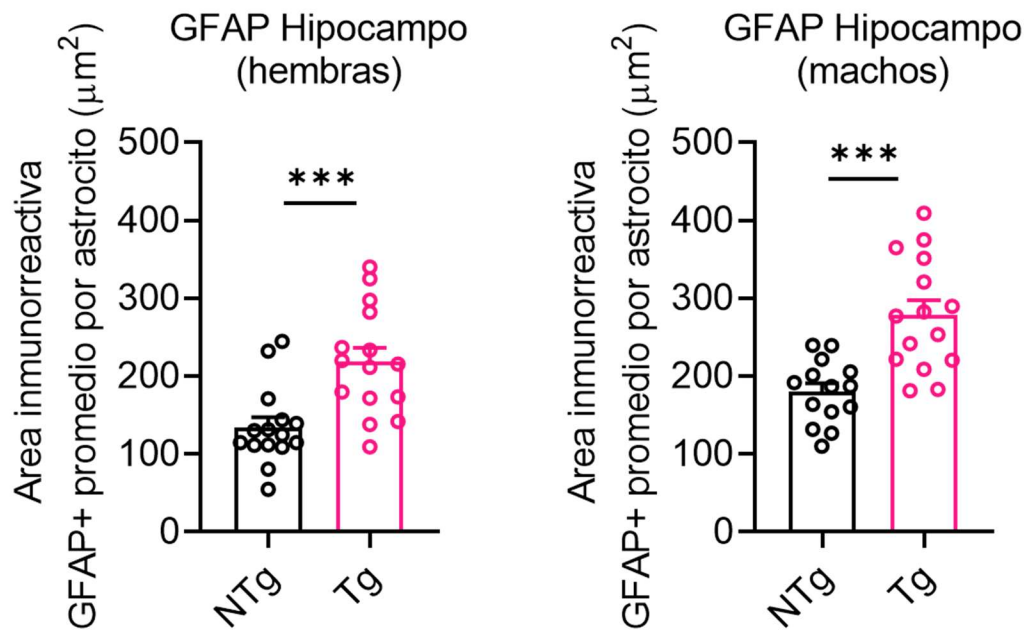


Figura 43. Cuantificación del área inmunorreactiva de GFAP por célula en hembras (izquierda) y machos (derecha; prueba t de Student bilateral; ***p < 0,001; n = 14-15). El n corresponde al valor promedio de las células presentes en un campo.

Luego de observar un aumento en el área inmunorreactiva de GFAP en el hipocampo de los ratones transgénicos, quisimos profundizar en la caracterización del estado de activación de los astrocitos evaluando la expresión de S100B, un marcador asociado a la reactividad astrocitaria. S100B es una proteína de unión a calcio de la familia S100, involucrada en la regulación de procesos como proliferación, diferenciación y respuesta al daño neuronal, cuya sobreexpresión se ha vinculado con estados de activación proinflamatoria. En nuestro estudio, los ratones transgénicos presentaron una mayor proporción de área inmunorreactiva de S100B colocalizada con GFAP en astrocitos del hipocampo (Fig.44), en comparación con los controles, lo que refuerza la evidencia de un incremento de la reactividad astrogliar en este modelo *in vivo* de EA.

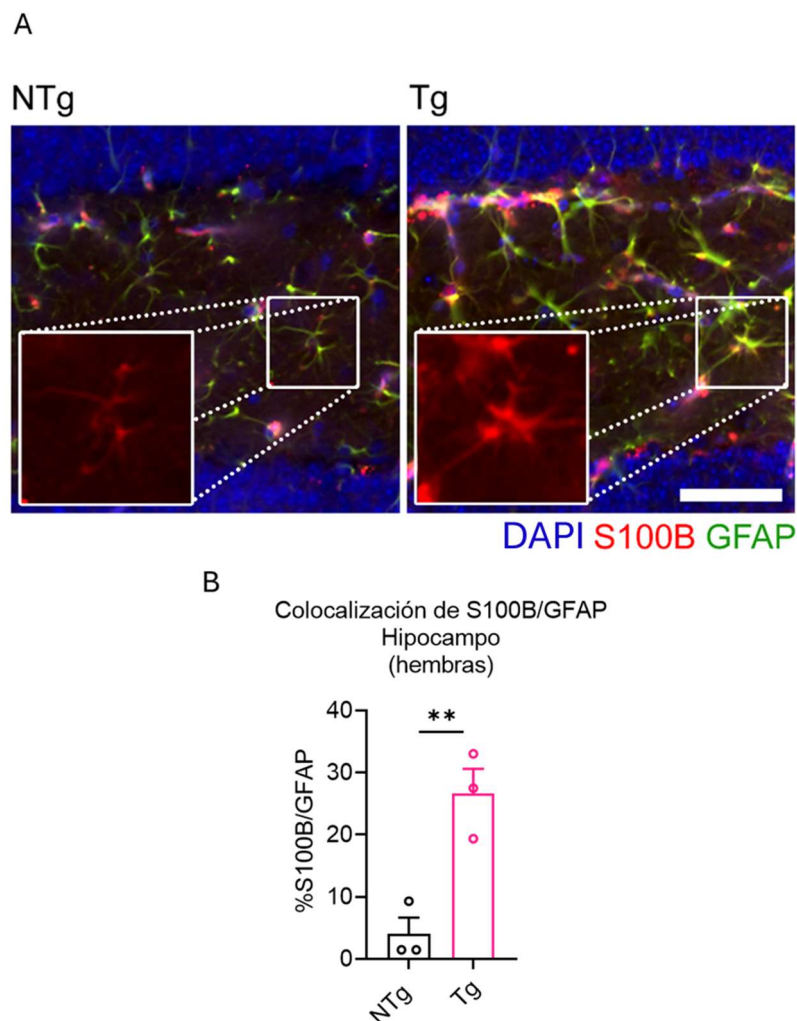


Figura 44. A. Inmunofluorescencia para S100B (rojo), GFAP (verde) y DAPI (azul) en cortes hipocámpales de ratones NTg y Tg. **B.** Cuantificación del área inmunorreactiva de S100B colocalizado con GFAP por célula en hembras (prueba t de Student bilateral; **p < 0,01). n = 3 ratones por grupo.

Resultados *in vitro*

Resultados en la línea de astrocitoma de rata C6

Niveles de receptor y señalización de insulina en células C6

Para comprender cómo se ven afectados los astrocitos de manera directa por la patología amiloide, empleamos modelos *in vitro*. De forma preliminar, realizamos un abordaje general utilizando la línea celular de astrocitoma de rata C6, con el fin de posteriormente profundizar los resultados poniendo a punto cultivos primarios de astrocitos murinos.

En primer lugar, evaluamos los niveles de receptor total de insulina con el objetivo de comprender si se veían afectados de igual manera que lo observado *in vivo* en los astrocitos hipocampales en respuesta al amiloide. De manera preliminar, observamos una tendencia a la disminución de la cantidad de receptores de insulina luego de exponer a los astrocitos a β -amiloide ($A\beta$) durante 24 h (Fig.45), de forma similar a lo encontrado *in vivo*.

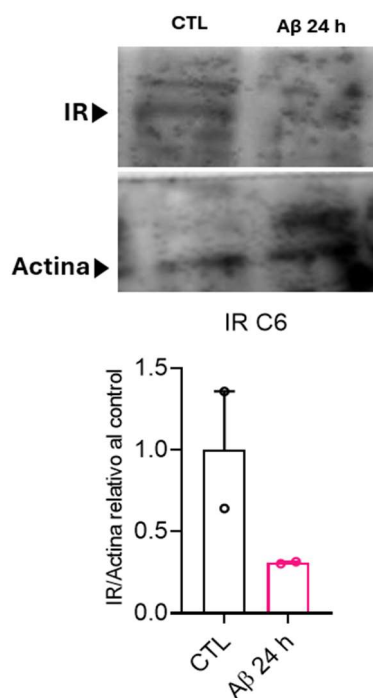


Figura 45. Ensayo de inmunoblot para IR/actina en extractos de proteínas provenientes de lisados de células de la línea astrocítica C6. n = 2 réplicas técnicas por grupo.

Posteriormente, evaluamos la señalización de insulina mediante el análisis de la fosforilación de Akt en los astrocitos de la línea C6 expuestos por 24 h a A β , en respuesta a un estímulo con insulina 1 μ M durante 15 minutos (Fig. 46). Como control positivo de señalización de insulina alterada, se añadió un grupo que en lugar de A β recibió palmitato (Vinuesa et al., 2016). Encontramos que, en respuesta al amiloide, la fosforilación de Akt se vio disminuida en igual magnitud que ante la exposición al palmitato, sugiriendo que esta condición promueve la resistencia a la acción de la insulina.

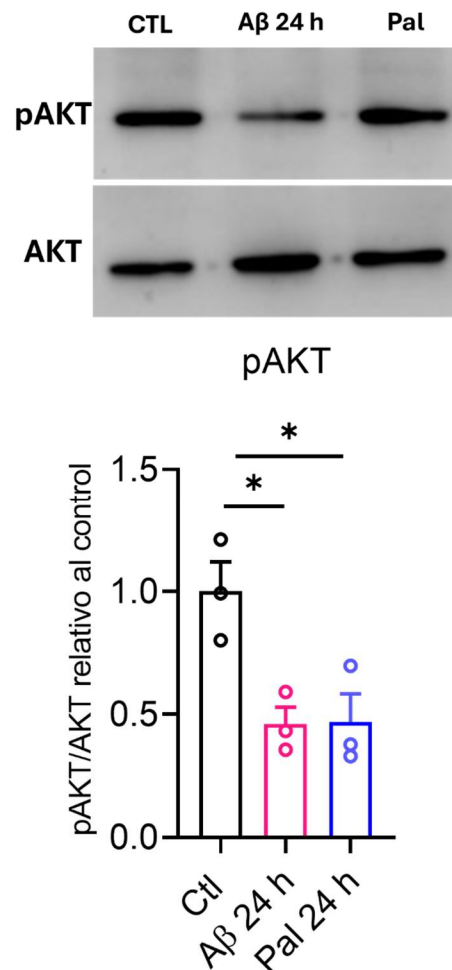


Figura 46. Ensayo de inmunoblot para pAkt/Akt en extractos de proteínas provenientes de lisados de células de la línea astrocítica C6 (ANOVA de una vía; test de comparaciones múltiples de Dunnett; * $p < 0,05$; $n = 3$ preparaciones celulares por grupo).

Estos resultados sugieren que la exposición de los astrocitos de la línea C6 al A β provoca una posible pérdida de receptores de insulina, llevando a la consecuente disminución de la señalización de la hormona.

Captación de glucosa marcada en células C6

Luego evaluamos si la captación de glucosa en células C6 se veía afectada por la exposición a A β y/o insulina. Para ello, tratamos un grupo con A β durante 24 h, otro solo con insulina durante 1 h, y un tercer grupo con ambos tratamientos. Después, incubamos las células durante una hora en un medio sin glucosa con 2-NBDG, un análogo fluorescente de glucosa. Finalmente, medimos la captación de glucosa a partir de los lisados celulares (Fig. 47A). Como resultado, observamos preliminarmente que la incubación con el A β se asoció a una tendencia hacia la disminución de la incorporación de glucosa (Fig. 47B). La exposición a la insulina mostró una tendencia similar hacia un menor contenido de 2-NBDG en los astrocitos.

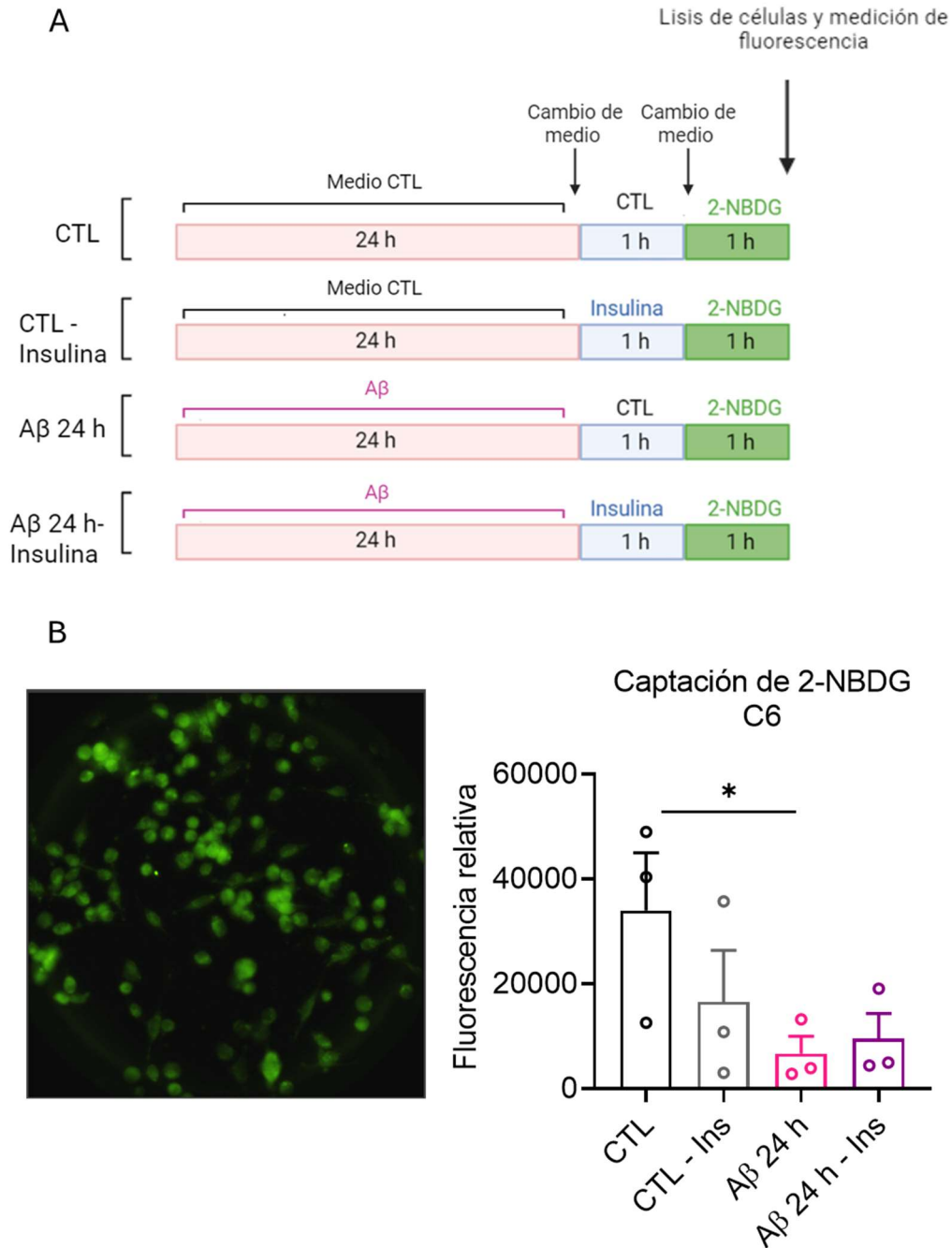


Figura 47. A. Esquema del experimento para determinar el efecto de A β y/o insulina en la captación de glucosa por células C6. **B.** Imagen de fluorescencia representativa de las células después de haber sido incubadas con 2-NBDG (izquierda). Cuantificación por fluorómetro de la captación de 2-NBDG en la línea C6 (ANOVA de una vía; test de comparaciones múltiples de Sidak; * $p < 0,05$). $n = 3$ pocillos lisados por grupo (derecha).

Estos estudios preliminares realizados en la línea celular C6 sugirieron que la exposición al A β induce alteraciones en la señalización de insulina en astrocitos, evidenciadas por una tendencia a la disminución de los niveles del receptor de insulina y por una menor fosforilación de Akt en respuesta a la hormona. Este efecto fue comparable al observado con palmitato, un conocido inductor de resistencia a la insulina, lo que refuerza la hipótesis de que el A β puede contribuir al desarrollo de un fenotipo glial resistente a la insulina. Además, se observó una tendencia a la reducción en la captación de glucosa, lo cual podría estar vinculado a la alteración de la señalización insulínica. En conjunto, estos resultados aportan evidencia funcional de que el A β impacta negativamente sobre el metabolismo de los astrocitos, y proporcionan una base sólida para profundizar estos hallazgos en modelos fisiológicamente más relevantes, como los cultivos primarios.

Resultados en cultivos primarios de astrocitos

Una vez explorada la respuesta metabólica astrocitaria al A β utilizando una línea celular, pasamos a un modelo *in vitro* de cultivo primario de astrocitos murinos. Dado que las células C6 tienen su origen en una línea tumoral, éstas presentan alteraciones genéticas, proliferación exacerbada y cambios en su metabolismo que podrían asociarse a una respuesta metabólica discrepante de aquella de los astrocitos primarios. Por otro lado, estos últimos derivan directamente del tejido cerebral, por lo que podrían conservar muchas de las características fenotípicas, moleculares y funcionales de los astrocitos *in vivo*, incluyendo su metabolismo energético, su respuesta a señales neuronales y su interacción con otras células gliales.

Para esto, pusimos a punto los cultivos primarios de astrocitos hipocampales y corticales provenientes de la disección de cerebros de ratones neonatos C57BL/6 en el día postnatal P1-P3.

Activación inflamatoria de astrocitos primarios en respuesta al A β

Para evaluar la respuesta inflamatoria en astrocitos primarios, analizamos la translocación nuclear de NF κ B, un evento temprano clave en la activación inflamatoria. Para ello, expusimos las células durante 90 minutos a A β en dos concentraciones: 0,05 μ M y 0,5 μ M. Estas concentraciones han sido previamente utilizadas en estudios de nuestro grupo (Gregosa et al., 2019), donde se demostró que inducen cambios funcionales y morfológicos en astrocitos sin generar citotoxicidad significativa en

Resultados in vitro

los tiempos de exposición evaluados. Además, utilizamos LPS como control positivo, dado su efecto ampliamente documentado como inductor de la vía inflamatoria clásica en células gliales.

Luego de la exposición a los diferentes estímulos, fijamos las células y realizamos una inmunofluorescencia para NFκB para medir sus niveles en el núcleo y en el citoplasma y determinar la proporción de translocación nuclear expresada como un score de activación (Fig. 47A). Nuestros resultados demostraron que, a los 90 minutos, el tratamiento con LPS indujo un aumento significativo en la translocación nuclear de NFκB (Fig. 47B). La concentración de Aβ 0,5 μM indujo una translocación nuclear comparable en magnitud a la provocada por el LPS, motivo por el cual decidimos continuar los experimentos utilizando esta concentración.

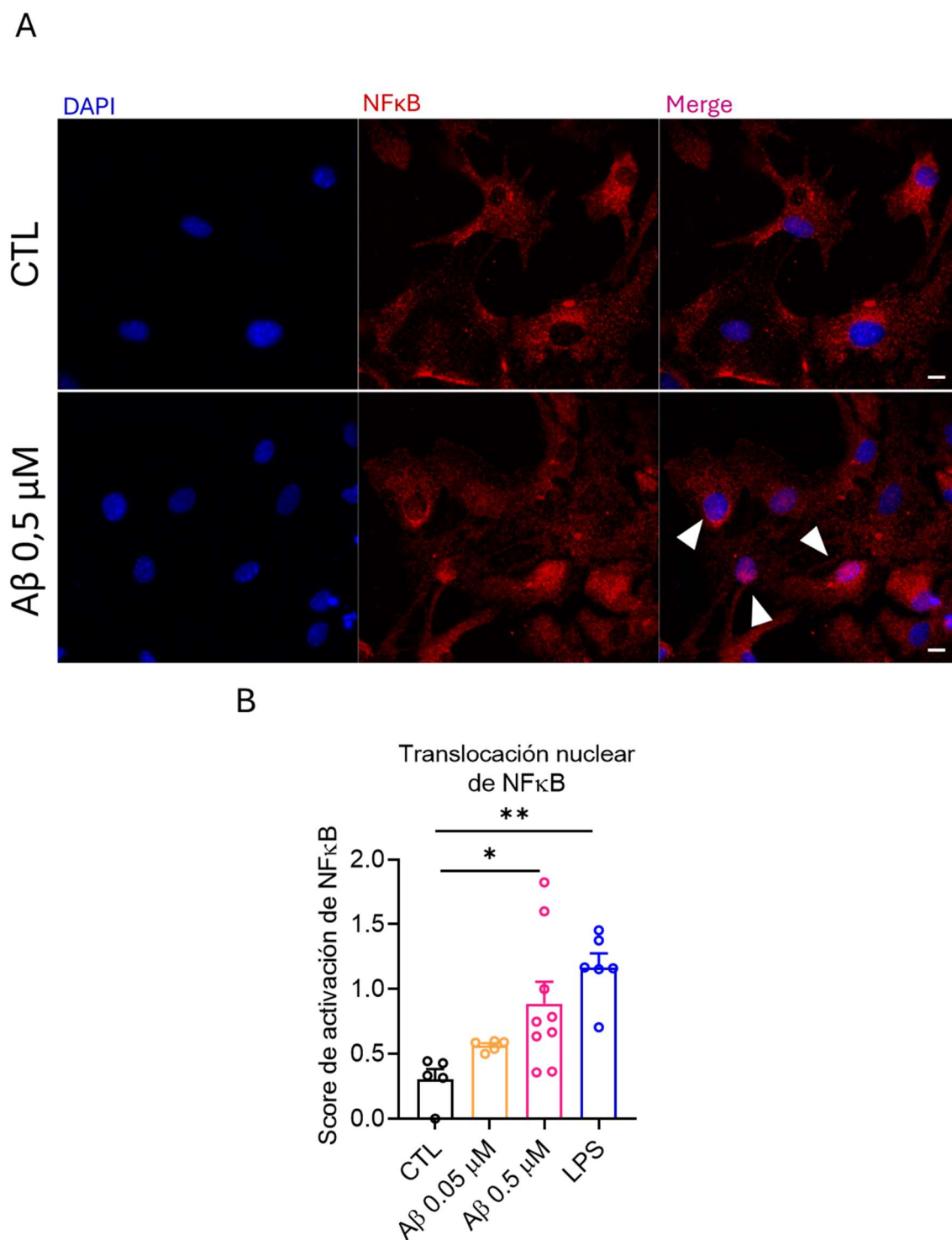


Figura 47. A. Inmunofluorescencia para NFκB en astrocitos primarios expuestos a 0,5 μM de Aβ durante 90 minutos. Barra de escala = 20 μm. B. Puntaje de activación basado en la translocación nuclear de NFκB en astrocitos primarios incubados en medio control (CTL), 0,05 μM de Aβ, 0,5 μM de Aβ o LPS

Resultados in vitro

como control positivo (ANOVA de una vía; prueba de comparaciones múltiples de Sidak; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $n = 5$ imágenes provenientes de cultivos primarios).

Por otro lado, medimos el tamaño celular cuantificando el área de cada célula en imágenes obtenidas por microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC; Fig. 48A). Observamos que, luego de 24 h de exposición a A β , las células exhibieron un aumento significativo en su área en comparación con las células control (Fig. 48B). Este incremento en el tamaño celular es coherente con un estado astrocítico más reactivo, ya que los astrocitos activados suelen mostrar cambios morfológicos característicos, como el ensanchamiento del citoplasma y una mayor complejidad de su red citoplasmática.

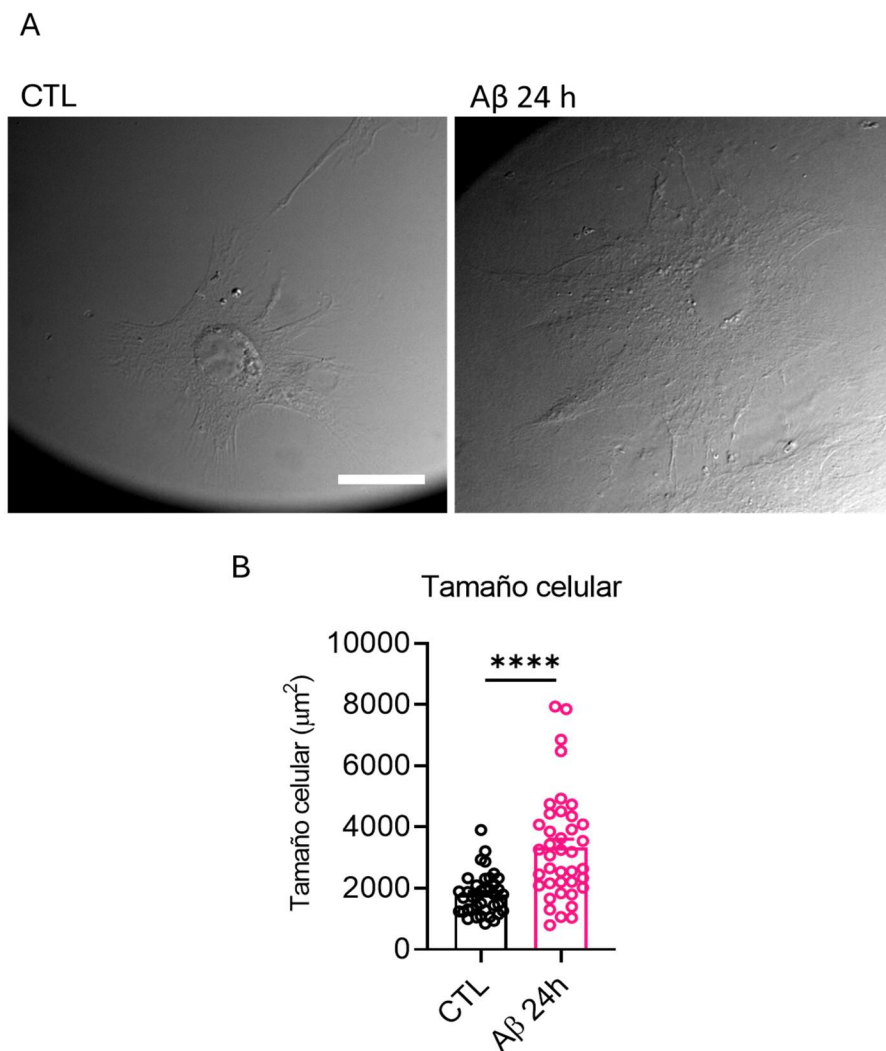


Figura 48. A. Imágenes obtenidas por contraste de interferencia diferencial (DIC) de cultivo primario de astrocitos. Barra de escala = 20 μm . **B.** Cuantificación del tamaño celular promedio en condiciones

Resultados *in vitro*

control o tras incubación con amiloide durante 24 h (prueba t de Student bilateral; ****p < 0,001; n = 40 células por condición).

Para profundizar la caracterización proinflamatoria de los astrocitos en cultivo en respuesta a A β , cuantificamos los niveles de expresión del marcador de astrocitos reactivos S100B mediante inmunofluorescencia (Fig. 49A), evaluando la densidad óptica de la señal. Nuestros resultados demostraron que, después de 24 h de exposición a A β , la densidad óptica de S100B se elevó significativamente en comparación con los controles, lo cual sugiere una mayor reactividad de los astrocitos en respuesta a este estímulo (Fig. 49B).

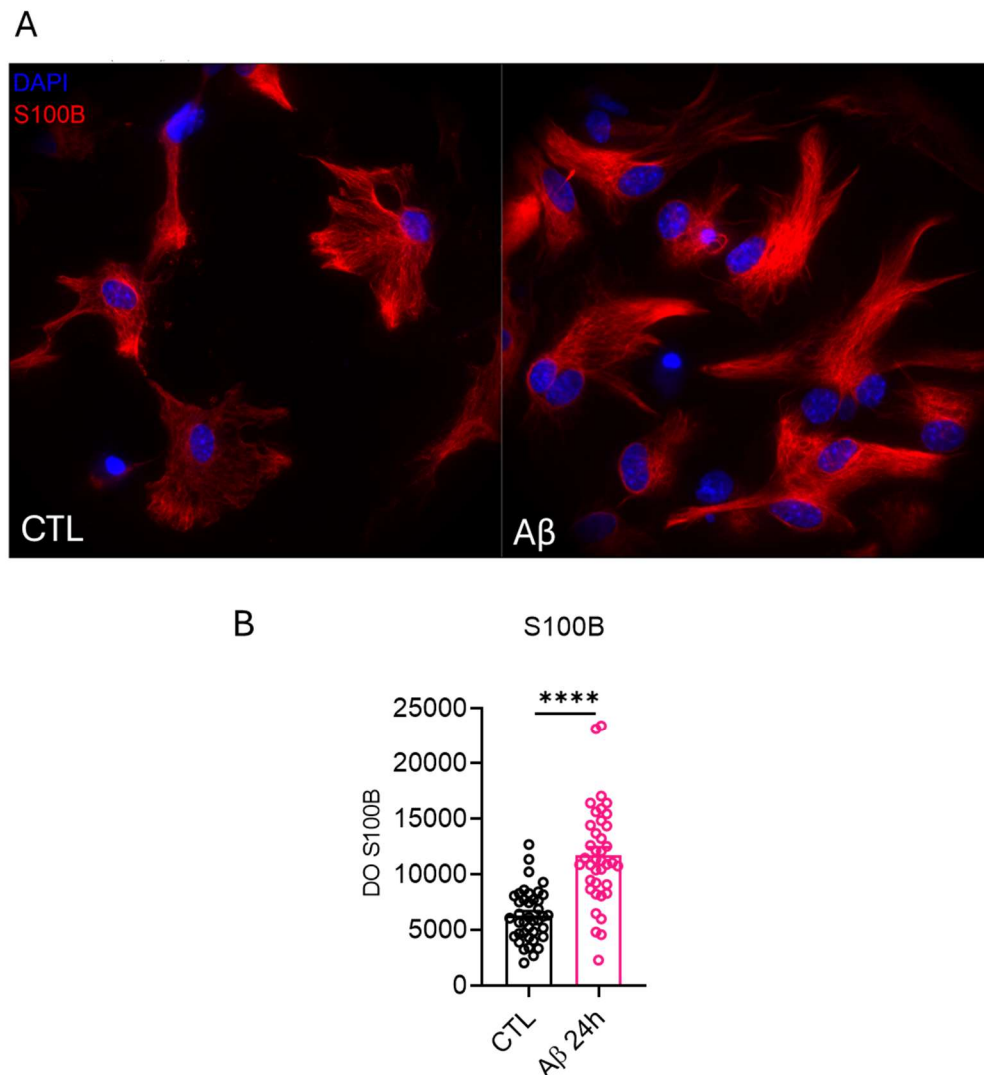


Figura 49. A. Inmunofluorescencia para S100B en astrocitos primarios incubados con 0,5 μ M de A β durante 24 h. **B.** Cuantificación de la densidad óptica (DO) de S100B en astrocitos primarios (prueba t de Student bilateral; ****p < 0,001; n = 40 células por condición).

Con el objetivo de evaluar un parámetro vinculado a la función homeostática de los astrocitos, analizamos la expresión del transportador de glutamato EAAT2 (también denominado GLT-1), un marcador cuya pérdida se ha asociado con astrocitos expuestos a condiciones de estrés e inflamación. Para ello, cuantificamos la densidad óptica de EAAT2 mediante inmunofluorescencia (Fig. 50A). Nuestros resultados mostraron que la exposición a A β provocó una disminución significativa en los niveles de EAAT2 (Fig. 50B), lo que indica una alteración en la capacidad de los astrocitos para mantener la homeostasis del glutamato y sugiere un entorno celular más vulnerable a la excitotoxicidad.

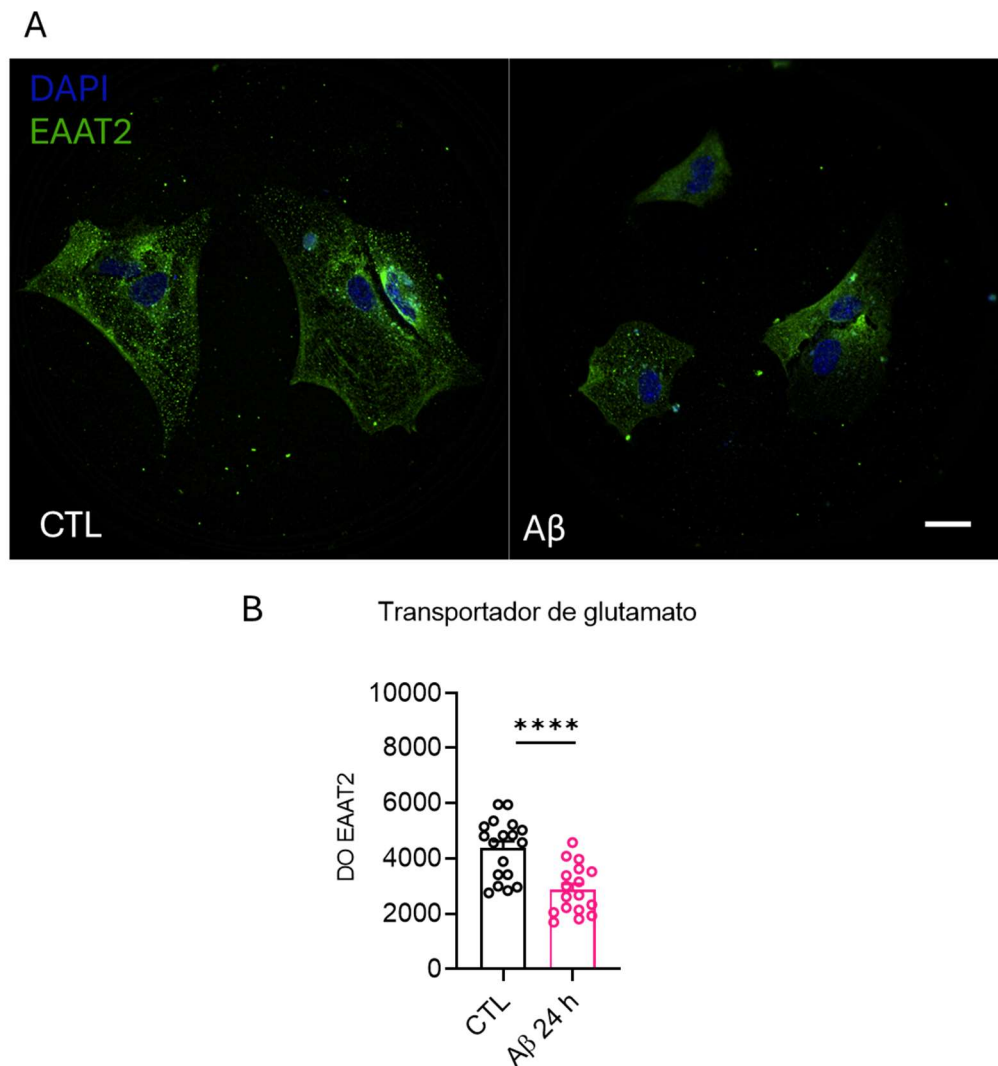


Figura 50. A. Inmunofluorescencia para el transportador de glutamato EAAT2 en astrocitos control y expuestos a A β . Barra de escala = 20 μ m. **B.** Cuantificación de la densidad óptica de EAAT2 en astrocitos

Resultados in vitro

control y expuestos a A β por 24 h (prueba t de Student bilateral; ****p < 0.0001; n = 20 células por condición).

Finalmente, evaluamos la producción de superóxido mitocondrial, estrechamente ligado con la reactividad astrogliar, en astrocitos mediante la medición de la densidad óptica de la sonda MitoSOX (Fig. 51A). Nuestros resultados mostraron que, luego de 24 h de exposición a A β , la densidad óptica asociada a MitoSOX aumentó significativamente (Fig. 51B), evidenciando un incremento en la producción de superóxido mitocondrial y, consecuentemente, una mayor reactividad astrogliar.

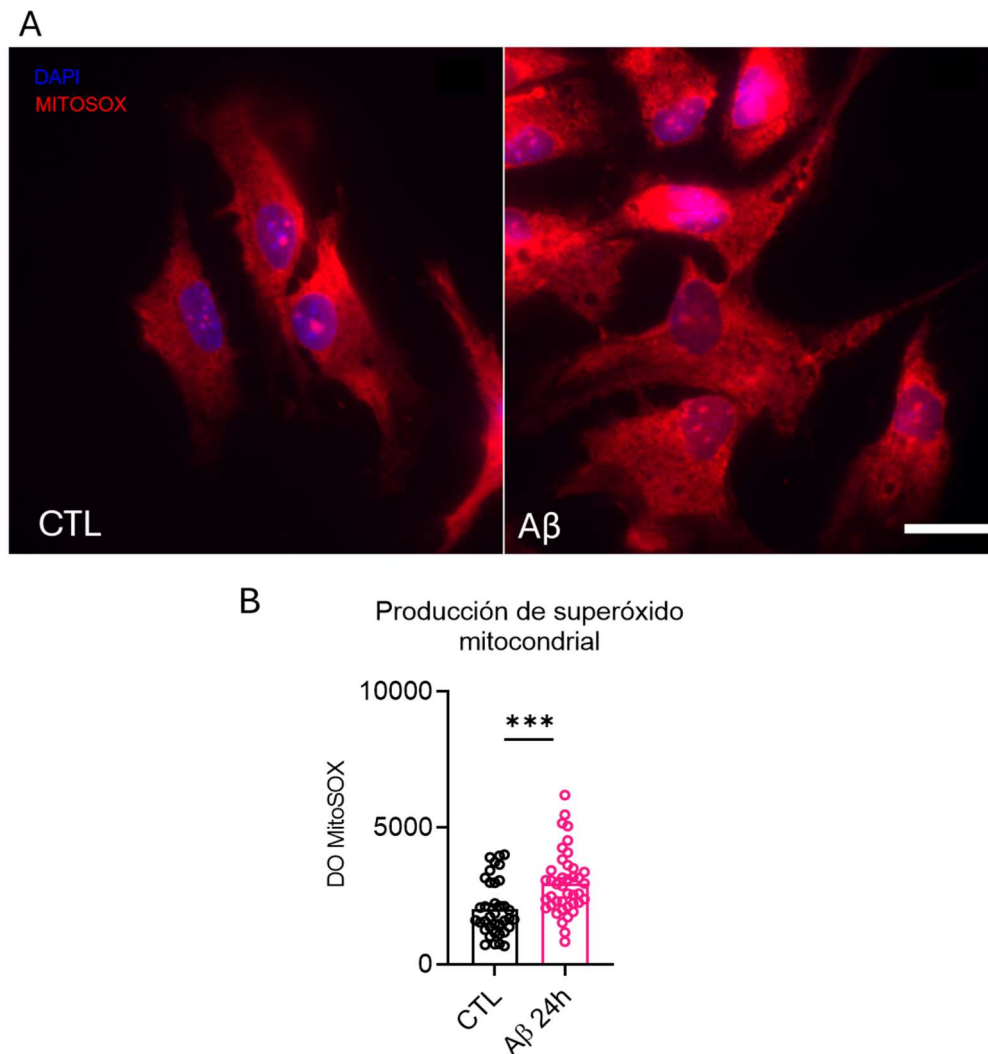


Figura 51. A. Tinción con MitoSOX en astrocitos primarios control y expuestos a A β . Barra de escala = 20 μ m. **B.** Cuantificación de la densidad óptica de MitoSOX en astrocitos primarios (prueba t de Student bilateral; ***p < 0,001; n = 40 células por condición).

Niveles de receptor y señalización de insulina en astrocitos primarios en respuesta a A β

Considerando que, *in vivo*, en los ratones Tg observamos una disminución en los niveles totales del IR en los astrocitos hipocampales, e *in vitro*, en células C6 esta disminución fue también observada luego de la exposición a A β , nos propusimos investigar la respuesta en astrocitos primarios.

Para ellos, medimos por Western Blot el nivel total de IR en astrocitos primarios luego de exponerlos durante 24 h a A β . Contrariamente a lo que observamos *in vivo* y en células C6, los astrocitos primarios expuestos al amiloide mostraron niveles aumentados de IR (Fig. 52).

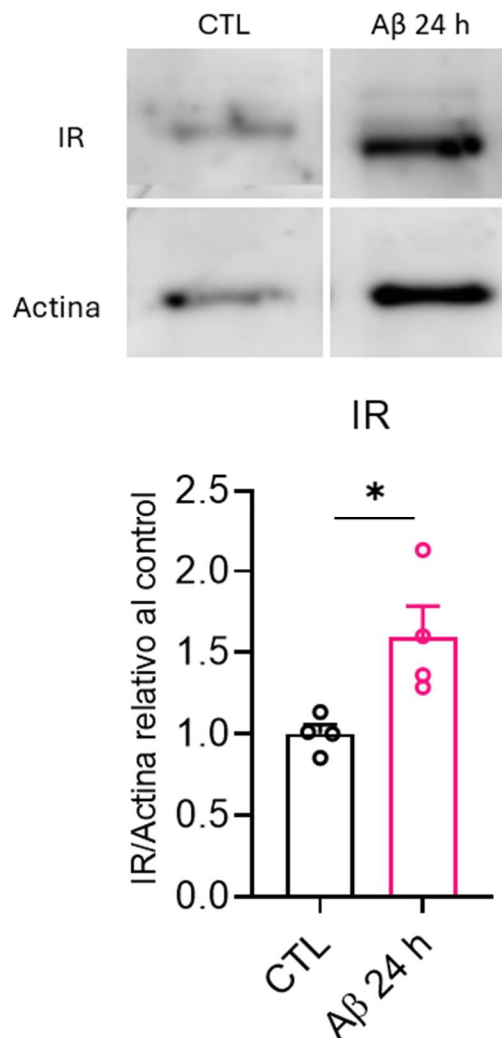


Figura 52. Inmunoblot para IR y actina en astrocitos luego de 24 h de exposición a A β (prueba t de Student bilateral; $p < 0,05$; $n = 4$ réplicas técnicas por grupo).

Posteriormente, analizamos la densidad óptica del IR mediante inmunofluorescencia (Fig. 53A). En línea con lo que observamos por WB, los astrocitos expuestos a A β durante 24 h mostraron una

expresión significativamente mayor de IR (Fig. 53B). Además, observamos que la señal de fluorescencia en los bordes celulares fue mayor en los astrocitos expuestos a A β (Fig. 53C), sugiriendo una mayor presencia del receptor en la membrana.

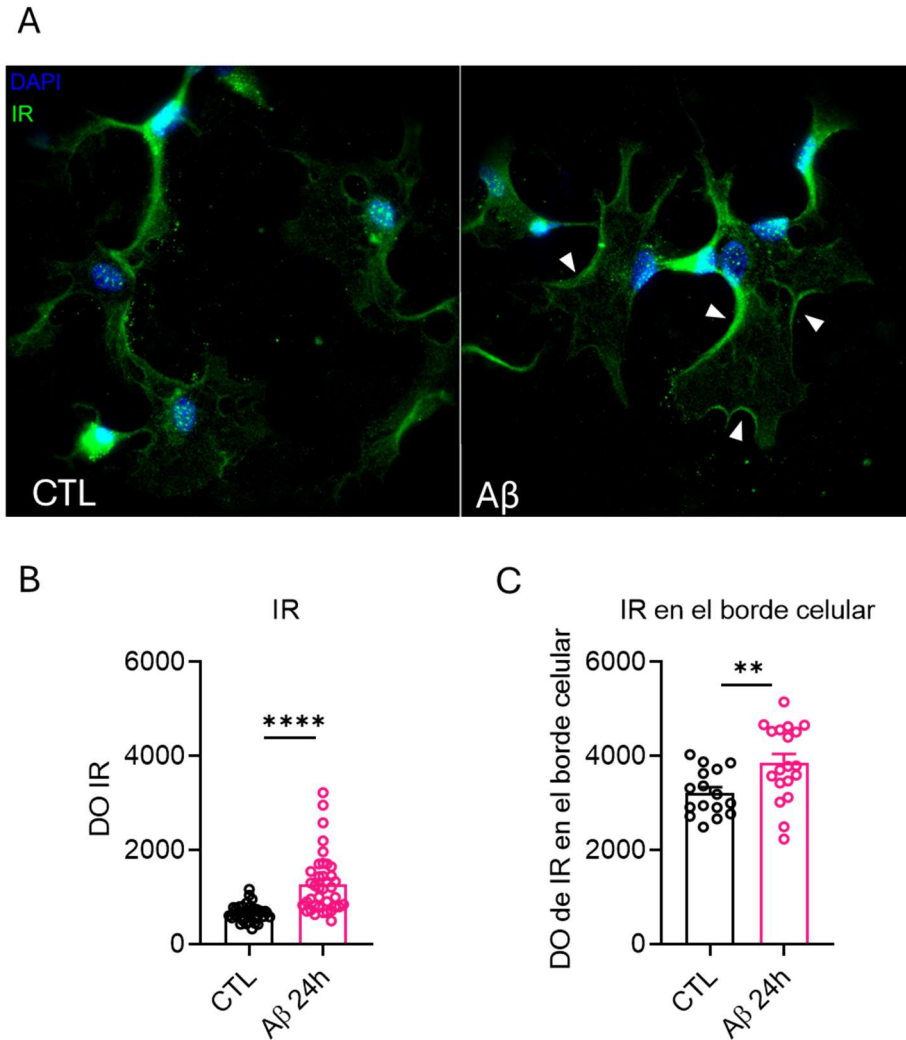


Figura 53. A. Imágenes confocales representativas de astrocitos primarios de ratón expuestos a medio control (CTL) o a A β durante 24 h, marcados fluorescentemente para el receptor de insulina (IR; verde) y contrateñidos con DAPI (azul). Las cabezas de flecha indican acumulación de IR en los bordes celulares. Barra de escala = 20 μ m. **B.** Cuantificación de la densidad óptica de IR en toda la célula (prueba t de Student bilateral; ****p < 0,001) y **(C)** en los bordes celulares (prueba t de Student bilateral; **p < 0,01; n = 14–30 células por grupo).

Este hallazgo sugiere que, frente al estímulo patológico y en conjunto con la adquisición de un fenotipo reactivo, los astrocitos podrían responder redistribuyendo sus receptores de insulina, de

manera que se localicen en mayor cantidad en la membrana plasmática en comparación con su compartimiento intracelular. Este fenómeno podría representar un mecanismo adaptativo para optimizar la captación y señalización de la insulina en un entorno alterado.

Luego, nos propusimos determinar la capacidad de los astrocitos de responder a la insulina en este contexto. En primer lugar, hicimos un experimento de puesta a punto para determinar cuánto tiempo de estímulo de insulina era necesario para activar su vía de señalización en astrocitos primarios. Observamos que una exposición corta de 15 minutos con 1 μ M de insulina (dosis utilizada para estimular las células C6) no fue capaz de activar la vía (Fig. 54A). Sin embargo, cuando prolongamos el estímulo a 2 h, la activación se vio aumentada (Fig. 54B).

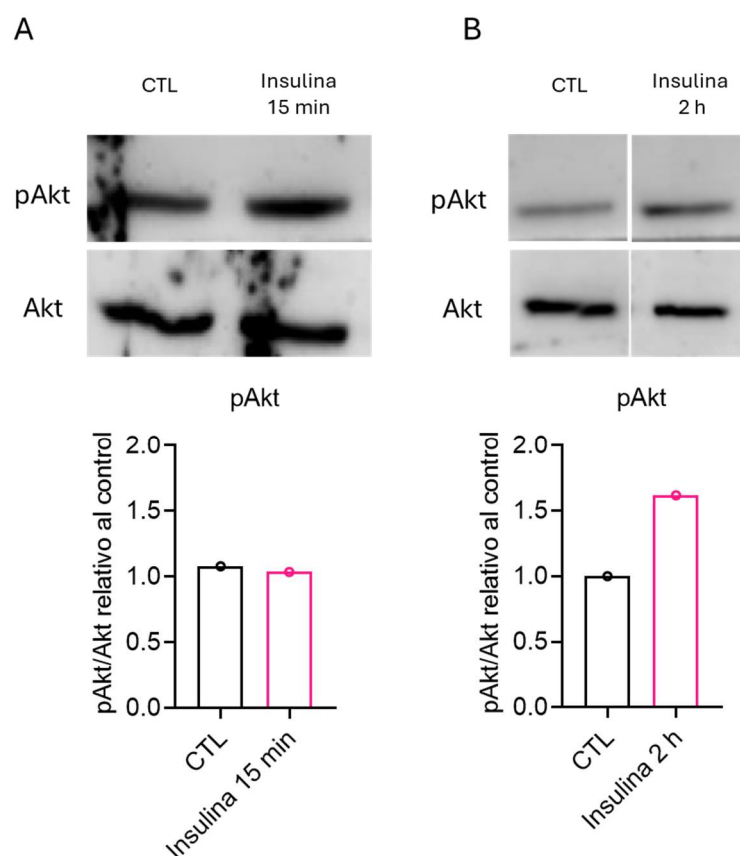


Figura 54. A. Inmunoblot para pAkt y Akt en astrocitos expuestos a un estímulo con insulina durante 15 minutos ($n = 1$ preparación celular por grupo) y **(B)** durante 2 h ($n = 1-2$ preparaciones celulares por grupo).

Por lo tanto, al continuar con los experimentos donde buscamos la activación de la vía de insulina, realizamos estímulos de 2 h con 1 μ M de insulina.

Resultados *in vitro*

De esta forma, incubamos a los astrocitos por 24 h con A β y durante las dos últimas horas de tratamiento, agregamos 1 μ M de insulina como estímulo de la vía. Para esto, medimos por western blot los niveles de fosforilación de Akt (Fig. 55) y de IR (Fig. 56), relativizando su forma fosforilada a la proteína total.

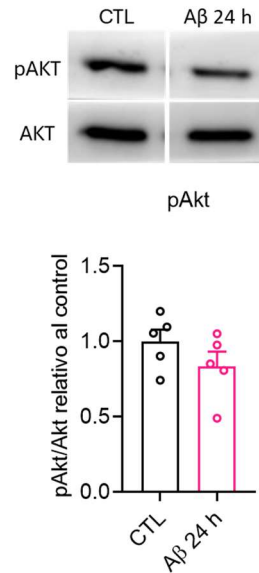


Figura 55. Inmunoblot para pAkt (fosforilación en S473) y Akt en astrocitos tras un estímulo con insulina durante las últimas 2 h del protocolo (n = 4 preparaciones celulares por grupo).

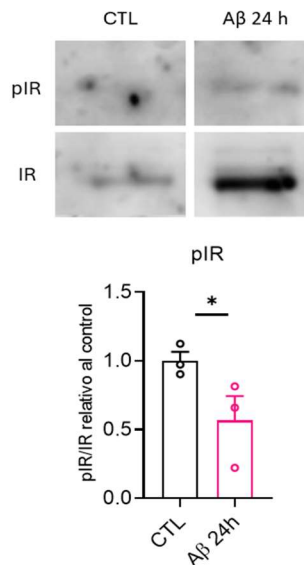


Figura 56. Inmunoblot para pIR (fosforilación en Y1361) e IR en astrocitos tras un estímulo con insulina durante las últimas 2 h del protocolo (prueba t de Student unilateral; p < 0,05; n = 3 preparaciones celulares por grupo).

Resultados *in vitro*

Sin embargo, cuando probamos preincubar a los astrocitos con A β por 24 h, luego lavar el medio y colocar el estímulo de insulina por 2 h, observamos que la activación de la fosforilación de Akt se vio restablecida (Fig. 57).

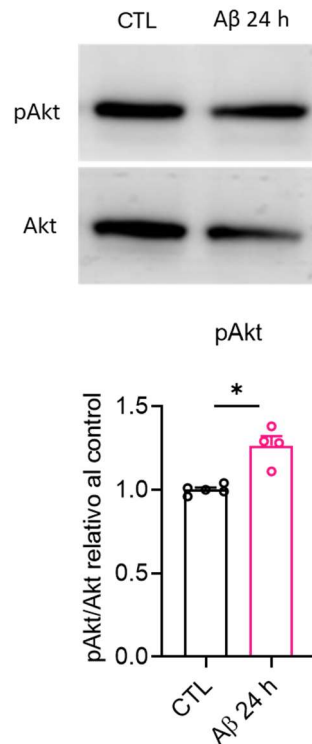


Figura 57. Inmunoblot para pAkt y Akt en astrocitos expuestos a un estímulo con insulina durante 2 h luego de finalizada la incubación con amiloide (prueba t de Student unilateral; $p < 0,05$; $n = 3$ preparaciones celulares por grupo).

En conjunto, estos resultados indicarían que, frente a la exposición a A β , los astrocitos tendrían una respuesta deficiente a insulina de manera reversible y podrían activar una respuesta compensatoria expresando más receptores de insulina, relocalizándolos en la membrana y mostrando una señalización incrementada solamente cuando se retira el amiloide del medio de cultivo.

Captación de glucosa de los astrocitos primarios en respuesta a A β y/o insulina

Posteriormente, nos propusimos evaluar si la alteración de la señalización de insulina estaba relacionada con la regulación del metabolismo de la glucosa en los astrocitos.

En primer lugar, evaluamos la capacidad de captación de glucosa de estas células en presencia de A β . Para esto, utilizamos la sonda 2-NBDG. Realizamos este ensayo tanto mediante fluorometría y

citometría de flujo, como a través de la toma de imágenes en tiempo real utilizando el sistema Incucyte.

Inicialmente, y de manera exploratoria, medimos la señal de 2-NBDG incorporado a las células durante 30 minutos posteriormente a haberlas expuesto a A β durante 24 h, mediante citometría de flujo (Fig. 58).

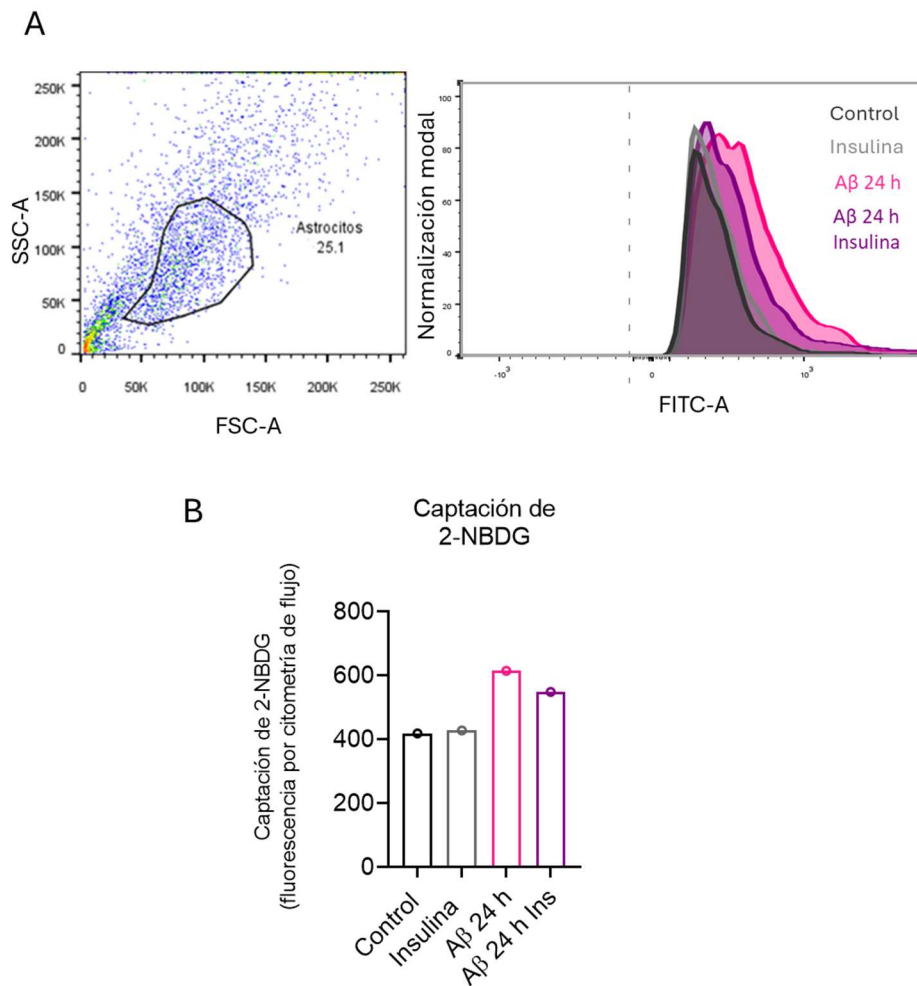


Figura 58. A. Diagrama de dispersión representativo del *gating* realizado en función de los parámetros de dispersión lateral (SSC-A) y frontal (FSC-A), utilizado para seleccionar la población celular de interés y excluir detritos (izquierda); histograma de la intensidad de fluorescencia (FITC-A) con normalización modal, donde se observan los diferentes picos correspondientes a la captación diferencial de 2-NBDG (derecha) **B.** Fluorescencia de 2-NBDG medida por citometría de flujo ($n = 1$ preparación celular por grupo).

Contrariamente a lo que habíamos observado previamente en la línea astrocitaria C6, encontramos preliminarmente por citometría de flujo, que los astrocitos primarios manifestaron un aumento en la captación de 2-NBDG luego de haber sido expuestos a A β (Fig. 58B).

Entonces, nos propusimos determinar si la captación de glucosa se veía diferencialmente afectada por diferentes tiempos de exposición a A β y si la insulina era capaz de modificarla. Para esto incubamos astrocitos primarios durante 2 o 24 h con A β y durante la última hora de incubación agregamos insulina. Seguidamente, reemplazamos el medio de cultivo por un medio sin glucosa e incubamos con 2-NBDG durante 30 minutos (Fig. 59). En este caso, al igual que con los preparados de células C6, medimos la fluorescencia con un fluorómetro a partir de los lisados de las células.

En primer lugar, comprobamos que una exposición corta al amiloide (2 h) fue capaz de inducir un aumento en la captación de glucosa posteriormente a la exposición al amiloide. En segundo lugar, la presencia de insulina durante la última hora revirtió el aumento inducido por A β .

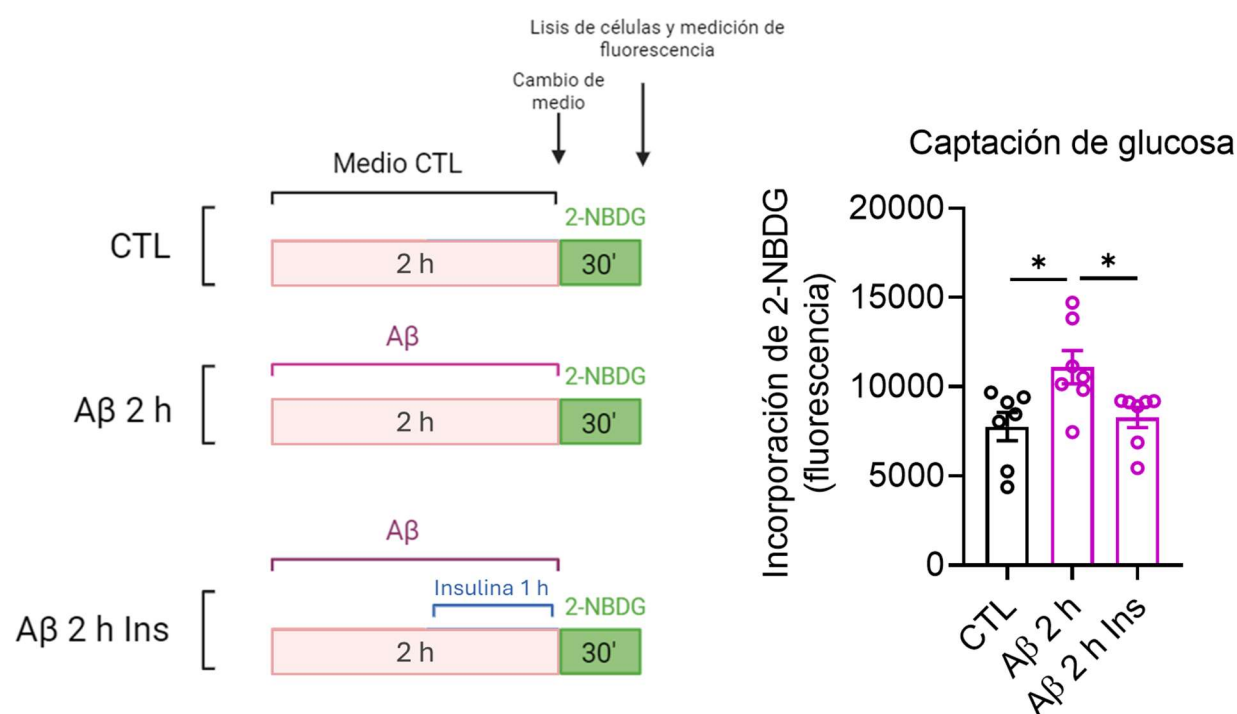


Figura 59. Esquema experimental y cuantificación por fluorómetro de la captación de 2-NBDG en astrocitos primarios incubados durante 2 h con 0,5 μ M de A β e insulina durante la última hora (Unidades de Fluorescencia Relativa = RFU; ANOVA de una vía; prueba de comparaciones múltiples de Sidak; $p < 0,05$; $n = 7-8$ réplicas por grupo provenientes de cultivos primarios obtenidos de 8 crías de ratón).

Luego, al repetir el procedimiento aumentando el tiempo de exposición con amiloide a 24 h (Fig. 60A), los astrocitos incubados con A β durante 24 h también presentaron un aumento en la señal de 2-NBDG observado mediante la toma de imágenes en tiempo real con el sistema Incucyte (Fig. 60B, 60C). Por otro lado, de igual manera que a 2 h, la adición de insulina durante la última hora de incubación con A β revirtió el incremento en la captación de glucosa.

Para determinar si el efecto de la insulina dependía específicamente de la activación del IR o del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF1R), coadministramos inhibidores durante el tratamiento. Utilizamos por un lado BMS-536924, que inhibe tanto IR como IGF1R y, por otro lado, NVP-ADW742, que actúa de forma selectiva sobre IGF1R.

Como resultado observamos que, al coadministrar BMS con A β , se perdió el efecto inhibitorio de la insulina (Fig. 60C) mientras que no hubo diferencias en la captación de glucosa coadministrando con NVP (Fig. 60D).

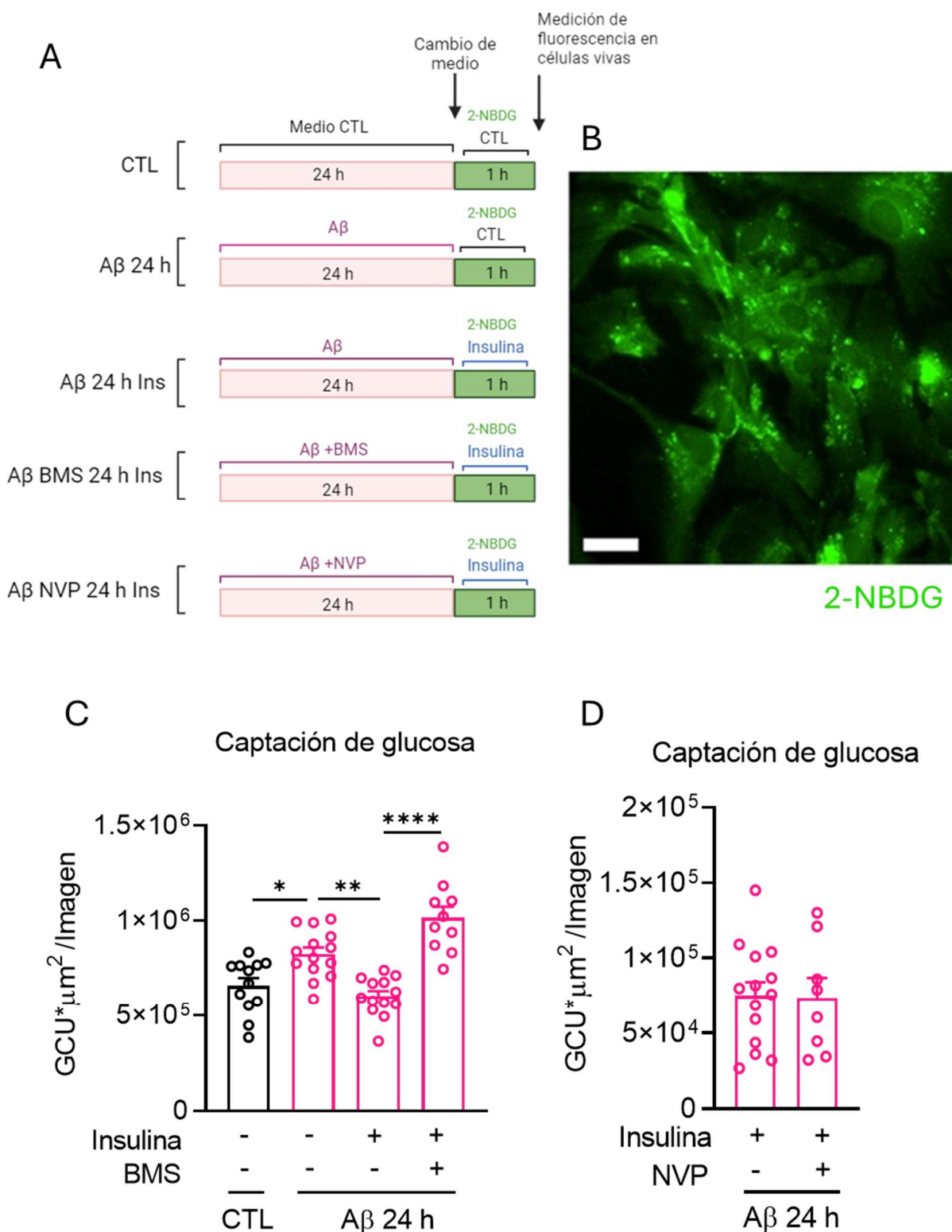


Figura 60. **A.** Esquema experimental. **B.** Imagen representativa obtenida con Incucyte de la captación de 2-NBDG en astrocitos primarios (barra de escala = 10 μm). **C.** Cuantificación de la captación de 2-

NBDG en astrocitos expuestos a A β durante 24 h en presencia o ausencia de insulina y/o del inhibidor de IR/IGF1R BMS durante la última hora (unidades calibradas en verde = GCU* μm^2 ; ANOVA de una vía; prueba de Sidak; **p < 0,01, ***p < 0,001; n = 10–14 imágenes provenientes de cultivos primarios). **D.** Cuantificación de la captación de 2-NBDG mediante imágenes de Incucyte en astrocitos expuestos a A β durante 24 h e insulina durante la última hora, con o sin el inhibidor de IGF1R NVP-ADW742 (unidades calibradas en verde = GCU* μm^2 ; n = 8-14 campos analizados por grupo).

Esto nos indica que la acción de la insulina estaría mediada principalmente por la funcionalidad de IR y no de IGF1R.

Estos hallazgos sugieren que, en condiciones proinflamatorias inducidas por A β , los astrocitos presentan una alteración funcional que afecta tanto su metabolismo energético como su capacidad de responder a insulina, con posibles consecuencias sobre la homeostasis del entorno neuronal.

Expresión del transportador de glucosa GLUT1 en astrocitos primarios en respuesta a A β e insulina

Para comprender mecanísticamente el aumento observado en la captación de glucosa, analizamos los niveles de expresión y la localización subcelular del transportador de glucosa 1 (GLUT1) en astrocitos primarios. GLUT1 es el principal transportador responsable del ingreso basal de glucosa a las células del sistema nervioso central, en particular en astrocitos, donde permite el abastecimiento energético desde la circulación hacia el tejido cerebral. A diferencia de otros transportadores como GLUT4, cuya actividad depende directamente de la señalización de insulina, GLUT1 se considera insulina-independiente. No obstante, su expresión y su distribución intracelular pueden ser moduladas por distintos estímulos metabólicos y hormonales, incluyendo el estado energético celular y, en ciertos contextos, la insulina de forma indirecta. Por ello, evaluamos cómo A β e insulina influyen su redistribución en la membrana plasmática, como posible mecanismo subyacente al aumento en la captación de glucosa observado en condiciones patológicas.

Observamos que los astrocitos incubados durante 24 h con A β presentaron un aumento en la localización periférica del transportador de glucosa GLUT1, lo que sugiere una redistribución de este transportador hacia la membrana celular. Este efecto se revirtió al añadir insulina durante la última hora del protocolo (Fig. 61A, 61B).

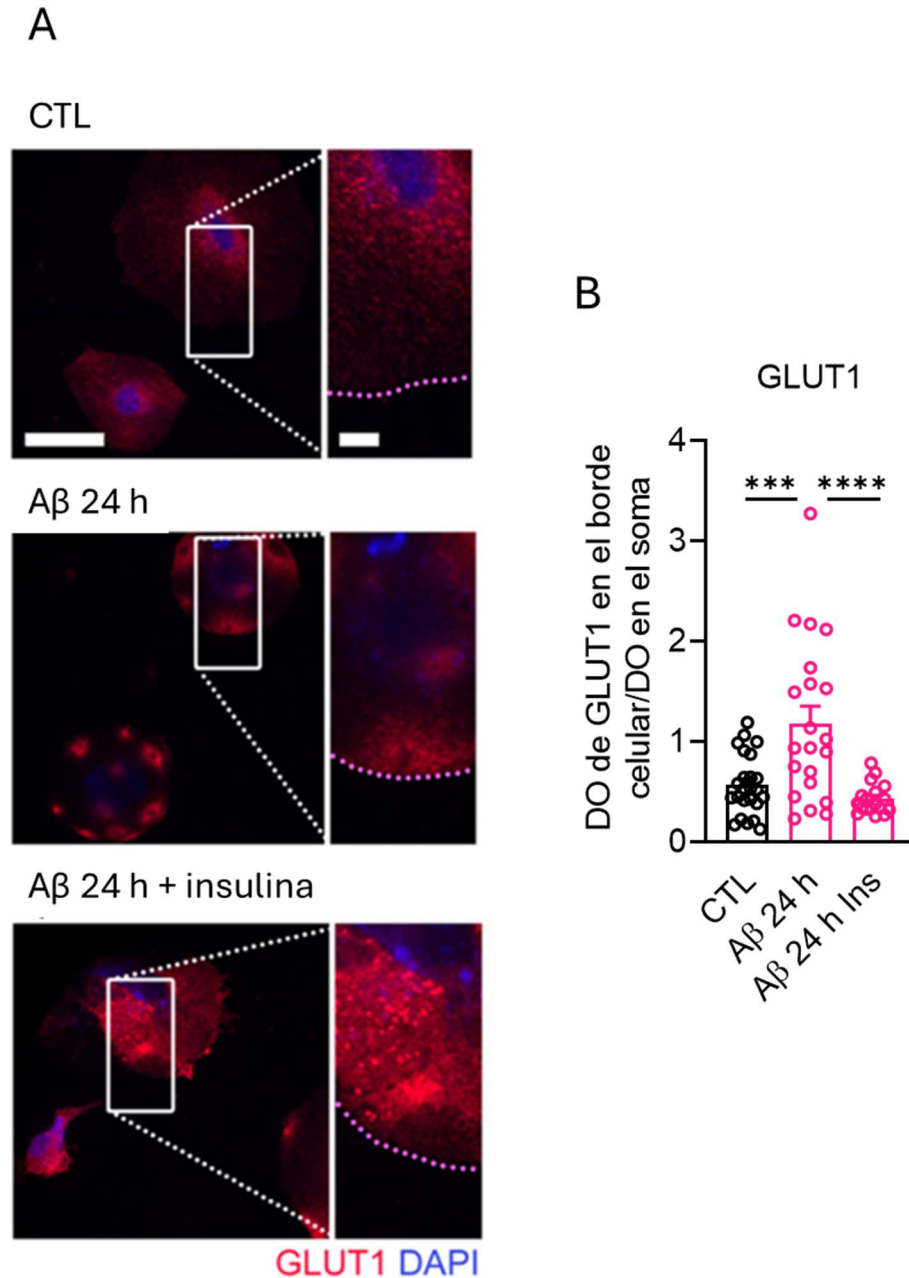


Figura 61. **A.** Imágenes confocales representativas de inmunofluorescencia para GLUT1 (rojo) en astrocitos expuestos a A β durante 24 h, en presencia o ausencia de insulina durante la última hora (contrateñido con DAPI en azul). Las líneas punteadas rosas en los recuadros indican el borde de las células (barras de escala = 50 y 10 μ m para la imagen general y el recuadro, respectivamente). **B.** Cuantificación del cociente entre la densidad óptica (DO) de GLUT1 en el borde celular y en el soma (ANOVA de una vía; prueba de Tukey; ***p < 0,005; **p < 0,001; n = 18–24 células por grupo, provenientes de cultivos primarios).

Liberación de lactato de los astrocitos primarios en distintos tiempos y condiciones de disponibilidad de nutrientes

Considerando la relevancia de la producción de lactato por parte de los astrocitos en distintos contextos nutricionales, y su estrecha relación con la captación de glucosa, evaluamos la liberación de lactato bajo dos condiciones de concentración de glucosa en el medio, utilizando un método colorimétrico. A su vez, evaluamos esta respuesta a dos distintos tiempos de exposición a A β .

Los resultados indicaron que la exposición a A β estimuló la liberación de lactato en astrocitos luego de 2 h de incubación en un medio con 5,5 mM de glucosa (bajos nutrientes), mientras que a las 24 horas este efecto no se evidenció (Fig. 62).

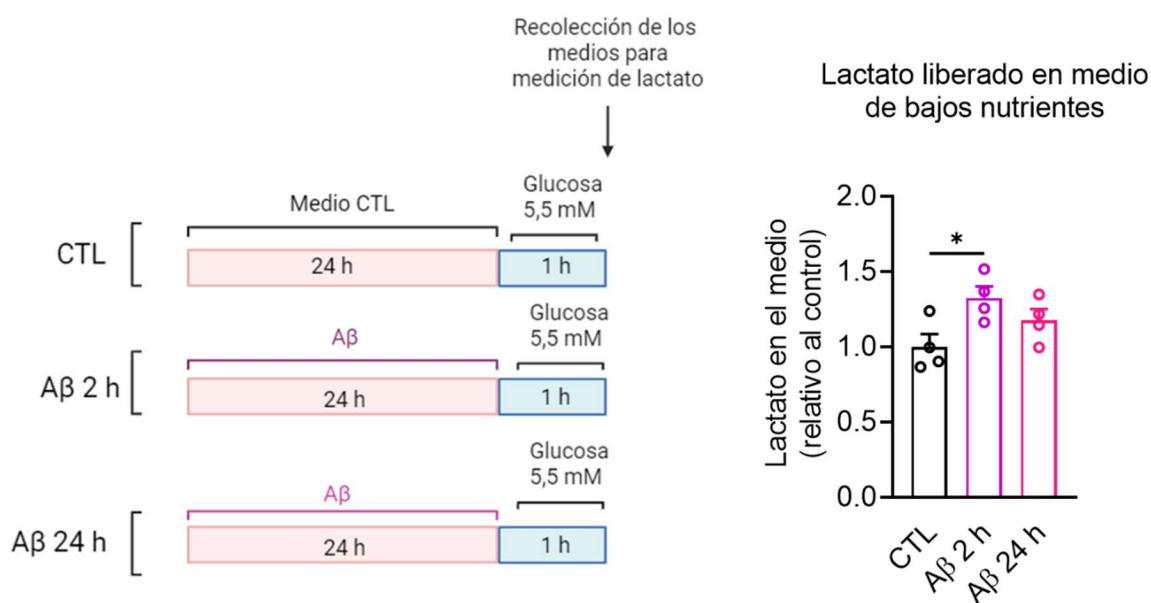


Figura 62. Liberación de lactato (absorbancia) recolectada durante 1 h tras la incubación con A β por 2 h o 24 h en un buffer Earle con 5,5 mM de glucosa (baja glucosa/bajos nutrientes; ANOVA de una vía; prueba de comparaciones múltiples de Sidak; *p < 0,05; n = 4 réplicas por grupo provenientes de cultivos primarios).

Cuando incubamos a los astrocitos en un medio con 17,5 mM de glucosa (altos nutrientes), la exposición a A β no produjo cambios en la liberación de lactato (Fig. 63).

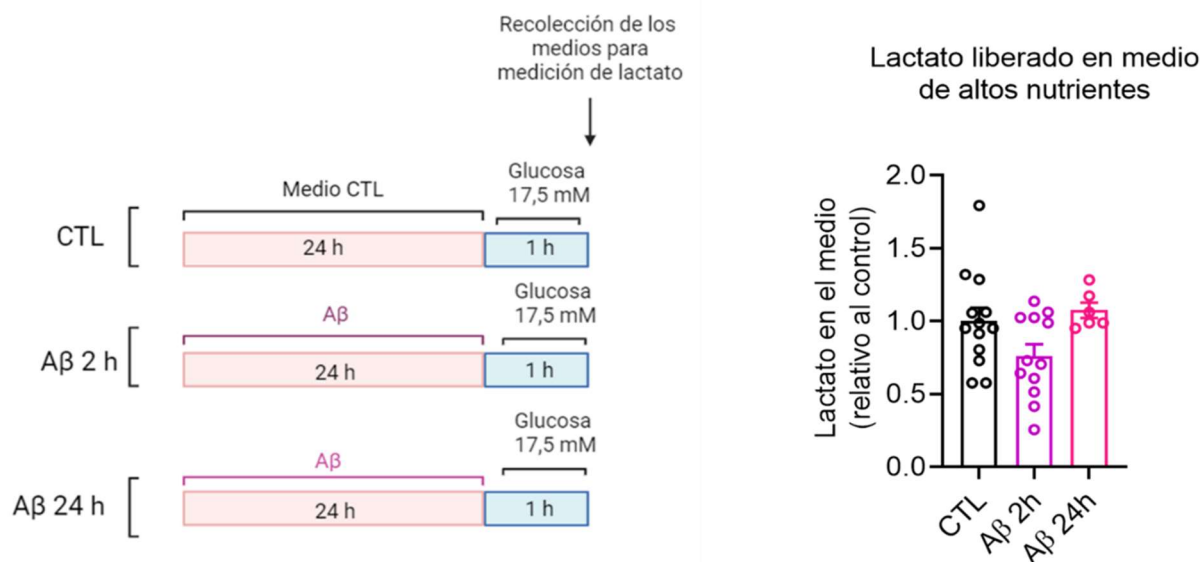


Figura 63. Liberación de lactato (absorbancia) recolectado durante las últimas 2 h de una incubación con Aβ por 2 h o 24 h en un medio DMEM-F12 con 17,5 mM de glucosa (alta glucosa/altos nutrientes; n = 5-13 réplicas por grupo provenientes de cultivos primarios).

Estos resultados sugieren que la respuesta de los astrocitos al Aβ sería más evidente a tiempos cortos (2 h), perdiéndose su capacidad de respuesta cuando el contexto patológico es prolongado (24 h) y, a su vez, esta capacidad de respuesta estaría modulada por la disponibilidad de glucosa.

Acumulación de glucógeno en astrocitos primarios en distintos tiempos y condiciones de disponibilidad de nutrientes

En este contexto, nos propusimos explorar la acumulación de glucógeno en astrocitos primarios expuestos a distintas concentraciones de glucosa y tiempos de cultivo, evaluando además el impacto del Aβ.

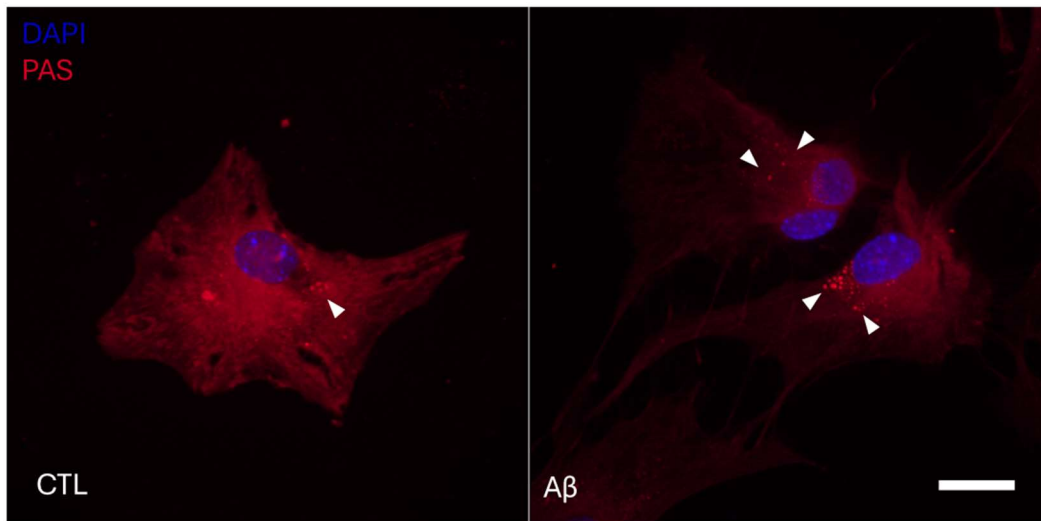
Por un lado, expusimos a los astrocitos a Aβ solo o a Aβ en combinación con 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB), un inhibidor competitivo específico de la glucógeno fosforilasa, una enzima clave en la movilización de glucosa a partir del glucógeno almacenado. El objetivo fue evaluar el contenido astroglial de glucógeno en presencia de Aβ, luego de incubaciones de 2 o 24 h (Fig. 63). Durante la última hora, las células fueron mantenidas en un medio de bajos nutrientes (5,5 mM de glucosa) (Fig. 63B), siguiendo el mismo protocolo que utilizamos previamente para la medición de

Resultados in vitro

lactato, al cabo de la cual se realizó la fijación y la tinción con la técnica de PAS para detectar glucógeno (Fig. 63A).

Nuestros resultados demostraron un aumento del contenido de glucógeno en ambos tiempos y la coincubación con DAB no produjo diferencias. Como DAB bloquea la degradación de glucógeno, al no observar acumulación adicional cuando se combinó con A β , suponemos que la exposición al A β fue suficiente para inhibir completamente esta vía de degradación.

A



B

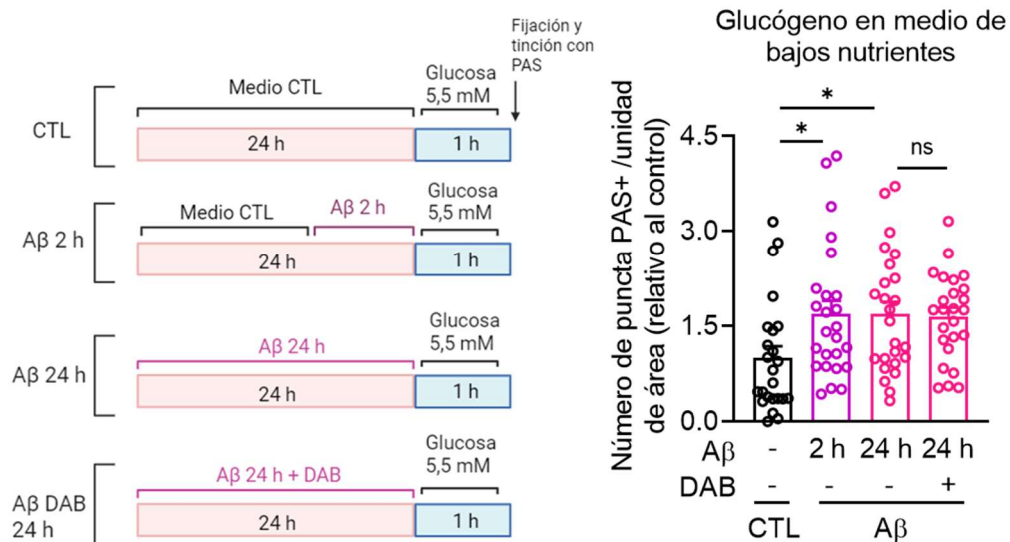


Figura 63. A. Imágenes confocales de astrocitos teñidos con PAS para evaluar el almacenamiento de glucógeno (contrateñido con DAPI en azul) en condiciones control o tras incubación con A β durante 24

h (barra de escala = 20 μm). **B.** Densidad de puncta PAS+ / μm^2 (relativa al control) en astrocitos expuestos a A β durante 2 h o 24 h y posteriormente 1 h en un buffer Earle con 5,5 mM de glucosa (ANOVA de una vía; prueba de Sidak; $p < 0,05$; $n = 24-30$).

Posteriormente, medimos los depósitos glucógeno incubando los astrocitos en un medio alto en nutrientes (17,5 mM de glucosa, Fig. 64) y encontramos un aumento significativo luego de la incubación de 24 h con A β .

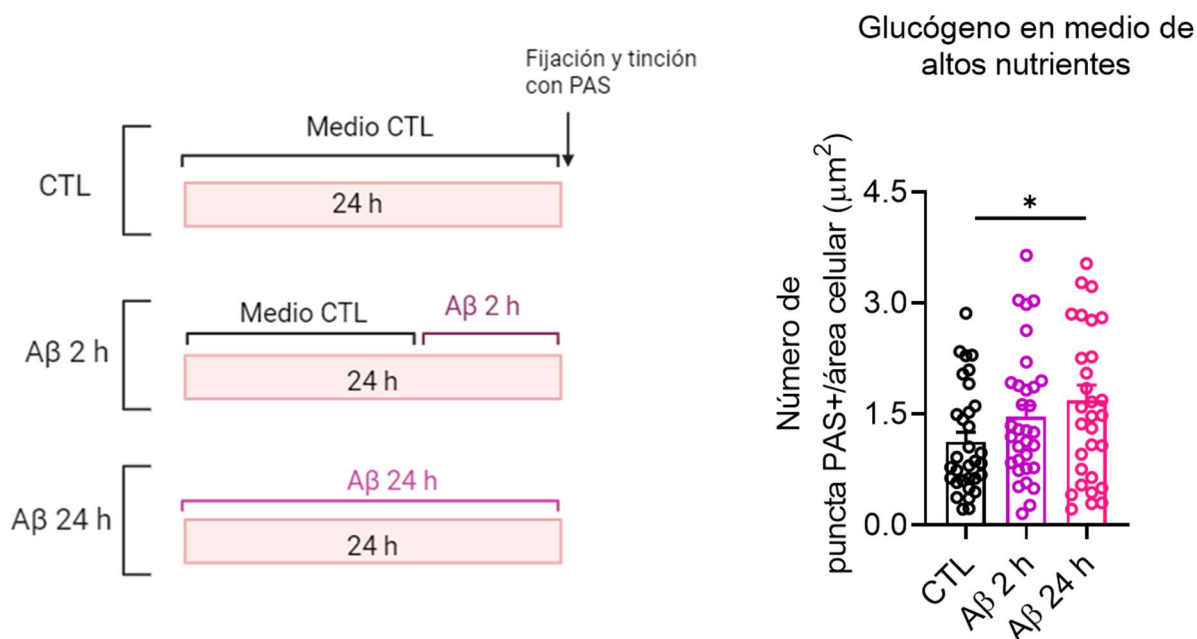


Figura 64. Densidad de puncta PAS+ / μm^2 (relativa al control) en astrocitos expuestos a A β durante 2 h o 24 h en medio DMEM-F12 con 17,5 mM de glucosa (ANOVA de una vía; prueba de comparaciones múltiples de Dunnett; * $p < 0,05$; $n = 24-30$).

En conjunto, estos resultados muestran que la exposición al A β modula de manera compleja el metabolismo energético de los astrocitos primarios, afectando tanto la captación de glucosa como la liberación de lactato y la acumulación de glucógeno, dependiendo del contexto y la disponibilidad de nutrientes. El aumento en la captación de glucosa inducido por A β , observado de forma consistente a distintos tiempos de exposición, se asocia con una redistribución del transportador GLUT1 hacia la membrana plasmática, lo que podría reflejar un mecanismo adaptativo de los astrocitos frente a un entorno patológico. Esta respuesta fue revertida por la insulina a través de una vía dependiente del IR, lo que destaca un posible deterioro en la sensibilidad a insulina inducido por A β . Además, la producción de lactato mostró una dependencia tanto del tiempo de exposición a A β

como del contexto nutricional, sugiriendo una regulación fina del acoplamiento astrogial ante diferentes demandas energéticas. Finalmente, la acumulación de glucógeno inducida por A β , sin cambios adicionales tras la inhibición de su degradación con DAB, sugiere que el péptido podría interferir con la movilización de esta reserva energética.

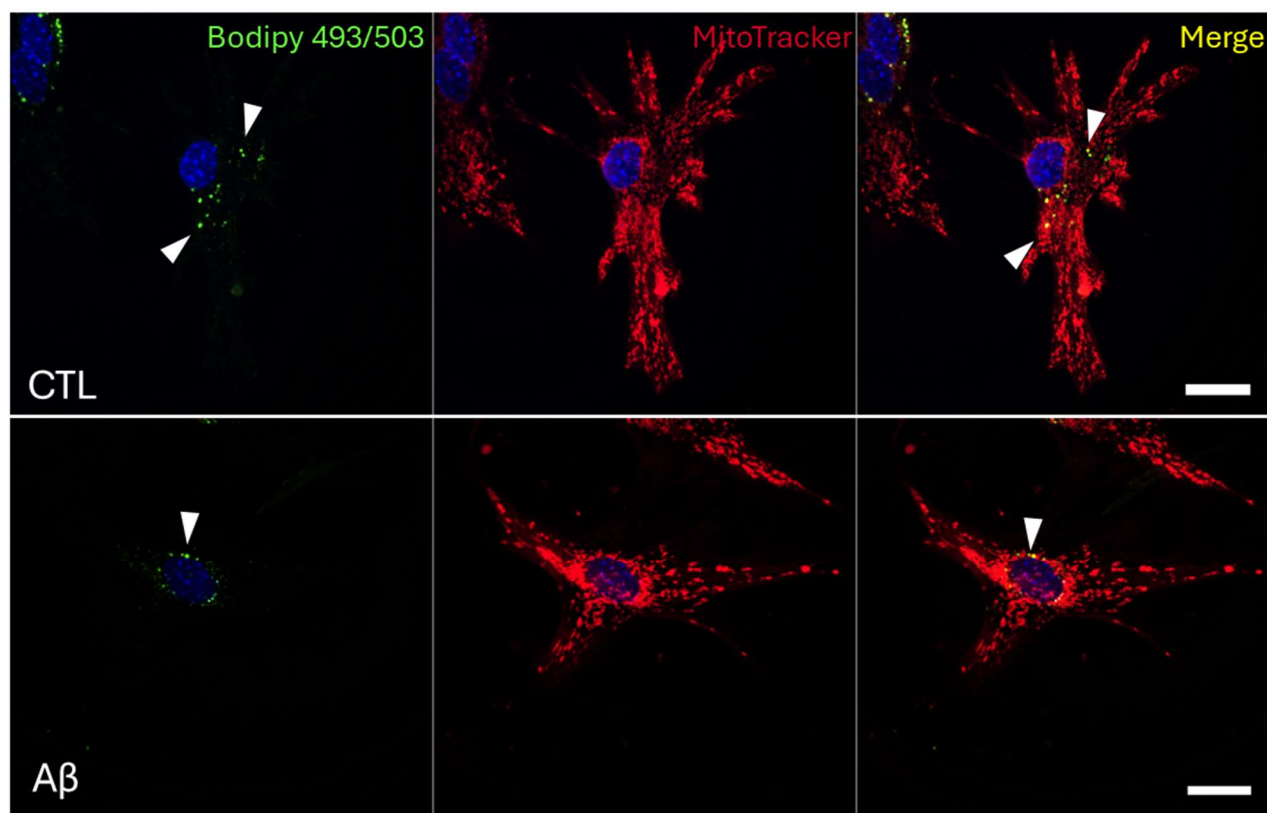
Acumulación de gotas lipídicas en los astrocitos en presencia de A β

En astrocitos, las gotas lipídicas no solo actúan como reservorios de lípidos neutros, sino que también participan en la respuesta a condiciones patológicas, como la exposición al A β . Diversos estudios (Ioannou et al., 2019; Smolič et al., 2021) han señalado un aumento en la formación de gotas lipídicas como mecanismo de protección frente al estrés oxidativo y mitocondrial. Dado que los astrocitos también dependen de la β -oxidación de ácidos grasos para la producción de energía, analizamos el almacenamiento lipídico tras la exposición al péptido amiloide.

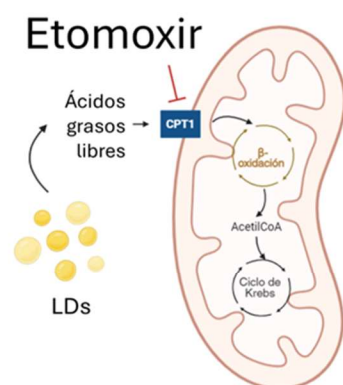
En primer lugar, analizamos la acumulación de gotas lipídicas después de 24 h de exposición a A β y su asociación con las mitocondrias (Fig. 65A). Para esto, utilizamos la sonda BODIPY 493/503, un marcador lipofílico que se incorpora selectivamente en lípidos neutros, como los triglicéridos y ésteres de colesterol, presentes en el núcleo de las gotas lipídicas. Esta sonda fluorescente emite en el rango verde y permite visualizar y cuantificar la cantidad y distribución de gotas lipídicas en células vivas o fijadas.

Luego de 24 h de exposición a A β , si bien no encontramos diferencias en la cantidad de gotas lipídicas (Fig. 65B), sí observamos una disminución en el tamaño de las gotas teñidas con la sonda (Fig. 65C). Este efecto se perdió cuando inhibimos el transporte de ácidos grasos hacia las mitocondrias mediante el inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I), etomoxir, lo que sugiere que la exposición al amiloide se asocia con un mayor uso de ácidos grasos.

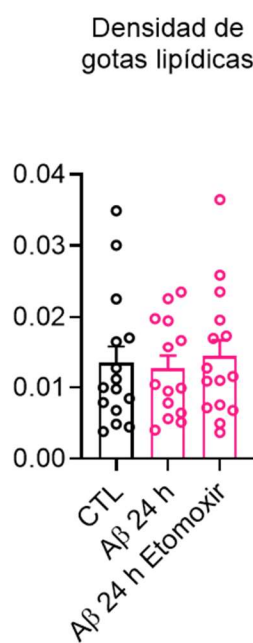
A



B



Número de partículas Bodipy 493/503+
/área celular (μm^2)



C

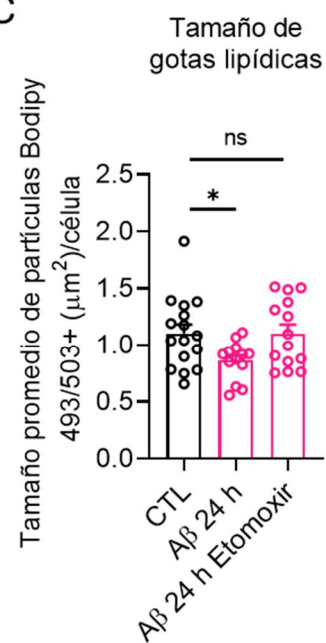


Figura 65. A. Imágenes confocales de astrocitos teñidos con las sondas MitoTracker (rojo) y BODIPY 493/503 (verde). Barras de escala = 20 μm . Densidad (**B**) y tamaño promedio (**C**) de gotas lipídicas

Resultados in vitro

marcadas con BODIPY en condición control o tras incubación con A β durante 24 h, con o sin el inhibidor de CPT1 etomoxir (ANOVA de una vía, prueba de comparaciones múltiples de Sidak, * $p < 0,05$; $n = 15-16$).

Para evaluar si el menor tamaño de las gotas lipídicas inducido por A β estaba relacionado con un aumento en la oxidación de ácidos grasos, analizamos el efecto de etomoxir sobre el potencial de membrana mitocondrial.

Tras 24 h de exposición a A β , la densidad óptica de MitoTracker se redujo en astrocitos co-tratados con etomoxir (Fig. 66), lo que indica que el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial dependería, al menos en parte, de la β -oxidación de ácidos grasos.

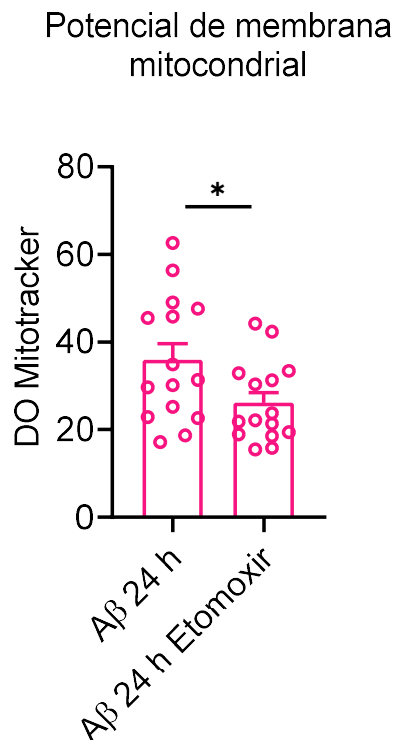


Figura 66. Densidad óptica de la sonda MitoTracker en astrocitos incubados con A β durante 24 h, con o sin etomoxir (prueba t de Student, $p < 0,05$; $n = 15$ células por condición). Todas las células fueron contrateñidas con DAPI (azul).

Como control para descartar un posible efecto tóxico de etomoxir sobre las mitocondrias, incubamos células control con el inhibidor y no encontramos diferencias en la densidad óptica de MitoTracker en comparación con las células tratadas con vehículo (Fig. 67).

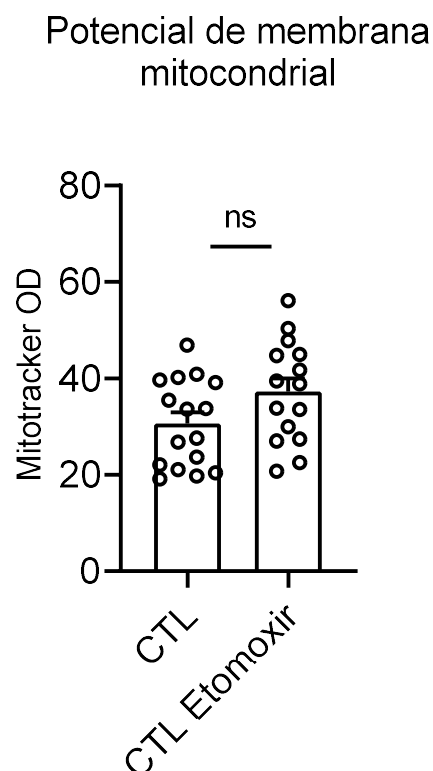


Figura 67. Cuantificación de la densidad óptica de MitoTracker en astrocitos control incubados con vehículo o etomoxir (prueba t de Student bilateral; n = 15 astrocitos provenientes de pocillos de cultivo independientes).

Carga mitocondrial en presencia de A β

Dado que las alteraciones mitocondriales contribuyen a la disfunción glial y al deterioro del entorno neuronal, en esta sección nos propusimos caracterizar los efectos del A β sobre la morfología y funcionalidad mitocondrial en astrocitos primarios. Además, evaluamos si la insulina, podía revertir o atenuar los efectos inducidos por el péptido.

Para medir la densidad y morfología mitocondrial utilizamos MitoSpy, que permite marcar a las mitocondrias independientemente del estado de las mismas, por lo cual es útil para analizar la morfología mitocondrial en general (Fig. 68A).

Con el objetivo de detectar posibles alteraciones estructurales inducidas por la exposición a A β , evaluamos tanto la densidad mitocondrial (Fig. 68B) como el tamaño promedio de las mitocondrias (Fig. 68C) utilizando la sonda MitoSpy. Luego de 2 o 24 h de tratamiento, no observamos diferencias

significativas en ninguno de estos parámetros, lo que sugiere que, al menos en estos tiempos de exposición, la cantidad total y la morfología general de las mitocondrias no se ven afectadas de manera evidente por el péptido.

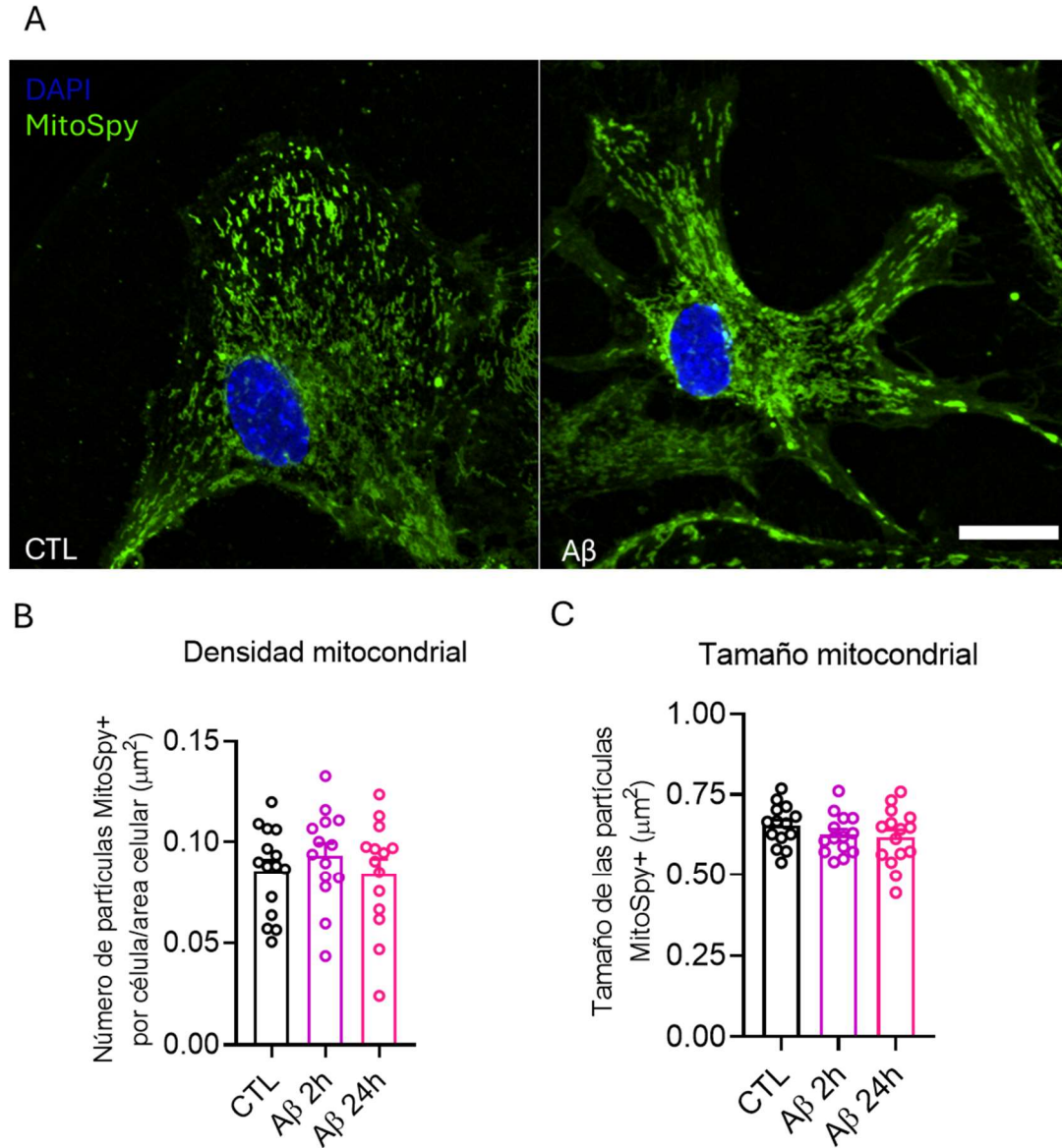


Figura 68. A. Imágenes confocales de astrocitos teñidos con MitoSpy (verde). Barras de escala = 20 μm. **B.** Cuantificación de la densidad de mitocondrias por célula. **C.** Cuantificación del tamaño promedio de las mitocondrias en astrocitos teñidos con MitoSpy. n = 15 células por condición. Todas las células fueron contrateñidas con DAPI (azul).

Estado funcional mitocondrial en presencia de A β e insulina

Posteriormente, realizamos una tinción de los astrocitos con la sonda MitoTracker Red (Fig. 69A), que se une a las mitocondrias activas en células vivas en función de la integridad de su potencial de membrana.

En este ensayo, incubamos a los astrocitos con A β durante 24 h, por un lado, o con A β en simultáneo con insulina también durante 24 h con el objetivo de estudiar si A β altera el estado funcional de las mitocondrias y si la presencia de insulina modula la posible alteración.

Como resultado, observamos que el tratamiento con A β se asoció con un aumento en el número de mitocondrias MitoTracker positivas (Fig. 69B) y una reducción en el tamaño (Fig. 69C), lo que sugiere que se produciría una fragmentación o fisión mitocondrial que disminuye el área funcional de estas organelas. Confirmando esta alteración, la densidad óptica de la señal de MitoTracker disminuyó en los astrocitos tratados con A β (Fig. 69D), lo que indica un deterioro en el potencial de membrana. Aunque la insulina no corrigió los cambios en el tamaño y número de mitocondrias, sí fue capaz de restaurar la intensidad de fluorescencia de MitoTracker, lo cual podría significar una preservación parcial de la funcionalidad mitocondrial.

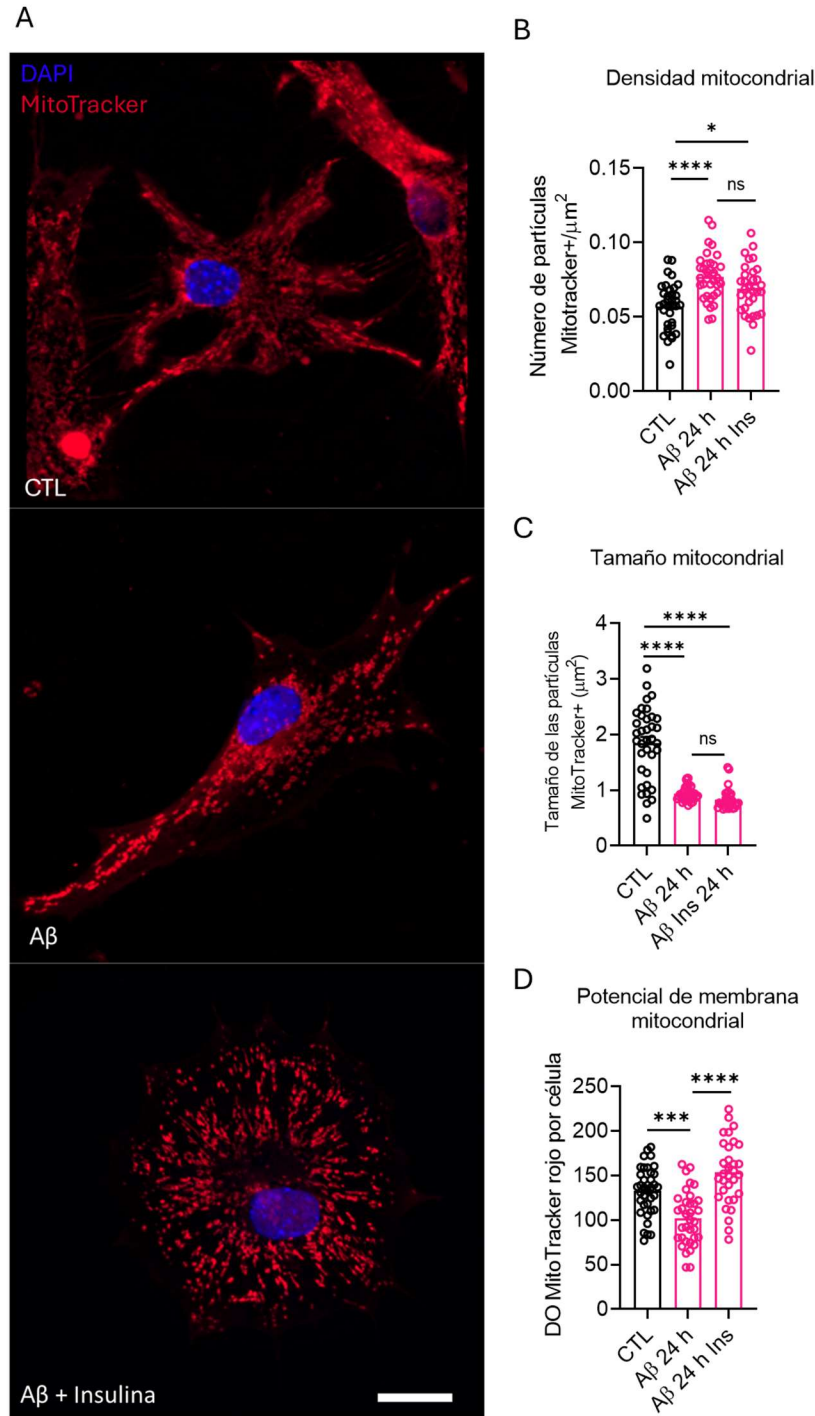


Figura 69. **A** Imágenes confocales de astrocitos teñidos con MitoTracker (rojo) y contrateñidos con DAPI (azul). **B.** Cuantificación de la densidad mitocondrial, el tamaño promedio (**C**) y la densidad óptica media (**D**) en astrocitos teñidos con MitoTracker (ANOVA de una vía, prueba de comparaciones múltiples de Sidak, * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$; $n = 35$ células por condición).

Estos resultados indican que la exposición a A β no provoca alteraciones evidentes en la morfología ni en la cantidad total de mitocondrias en astrocitos primarios, al menos en los tiempos evaluados (2 y 24 h). Sin embargo, sí detectamos cambios significativos a nivel funcional, evidenciados por una disminución en el potencial de membrana mitocondrial y un patrón compatible con fragmentación mitocondrial. Estos hallazgos sugieren que el A β compromete la funcionalidad mitocondrial antes de inducir alteraciones morfológicas visibles. Notablemente, la co-incubación con insulina fue capaz de revertir parcialmente esta disfunción, restaurando la señal de MitoTracker Red, lo que sugiere un posible efecto protector de la insulina sobre la bioenergética mitocondrial en condiciones de estrés inducido por A β .

Fagocitosis de A β en presencia de insulina

Los astrocitos juegan un papel crucial en el reconocimiento, la captación y la eliminación de los péptidos amiloides agregados en la EA. Sin embargo, la exposición sostenida a A β puede desencadenar alteraciones funcionales y estructurales en estos tipos celulares, incluyendo efectos adversos sobre la morfología y el metabolismo mitocondrial. En este contexto, y considerando que observamos una restauración del potencial de membrana mitocondrial en presencia de insulina, nos propusimos analizar cómo esta hormona influye en la incorporación de A β por parte de astrocitos primarios, y si su presencia es capaz de modificar la acumulación intracelular del péptido.

Para ello, incubamos astrocitos primarios con A β 0,05 μ M durante 1 h, y evaluamos su internalización. En paralelo, las células fueron expuestas simultáneamente a insulina en concentraciones de 0,1 o 1 μ M durante el mismo periodo de incubación.

Para la cuantificación, realizamos una inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo 4G8 para detectar A β (Fig. 70A), y nuestros resultados indicaron que la administración de 1 μ M de insulina aumentó significativamente la cantidad de amiloide intracelular (Fig. 70B).

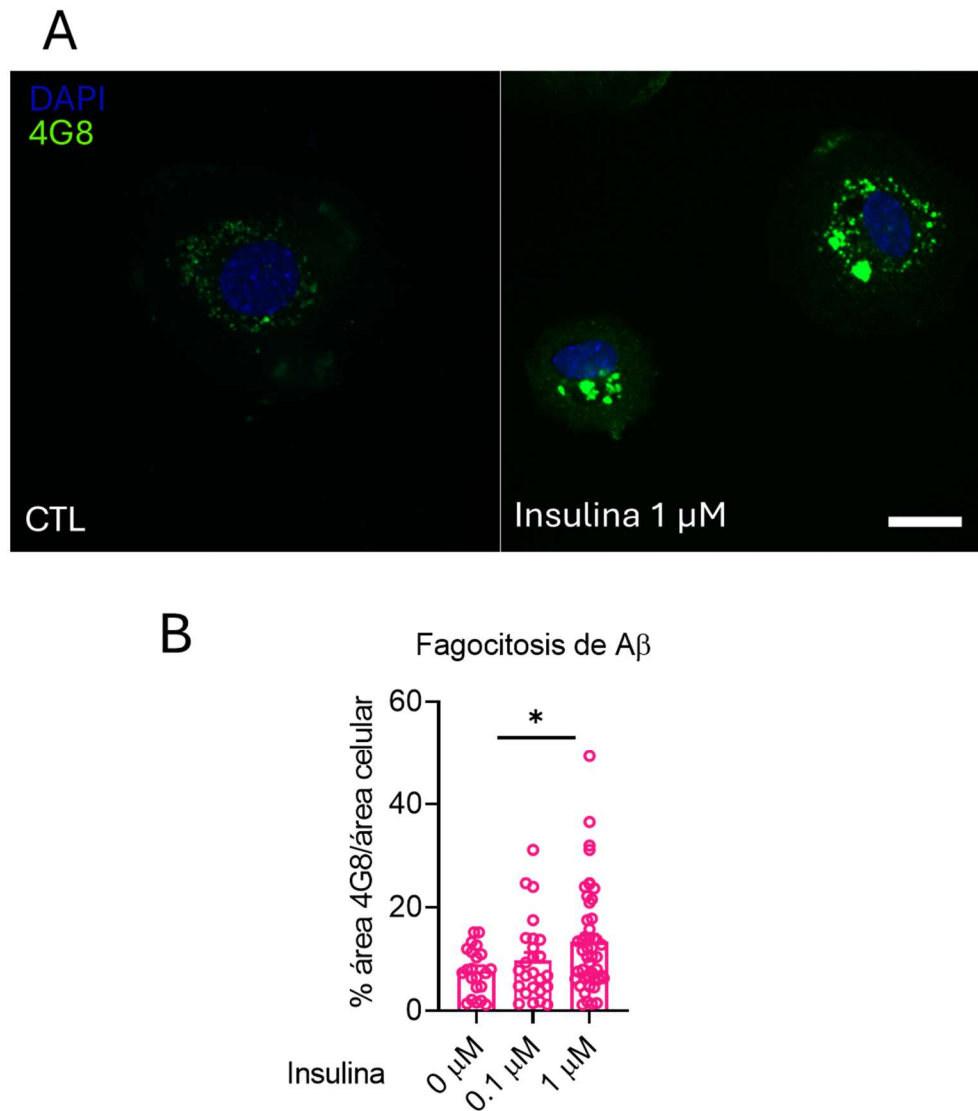


Figura 70. A. Imágenes confocales representativas de astrocitos incubados con 0,05 μ M de A β durante 24 h e insulina a concentraciones de 0, 0,1 o 1 μ M durante 1 h, inmunomarcados con el anticuerpo 4G8 para A β (verde) y contrateñidos con DAPI (azul). Barra de escala = 20 μ m. **B.** Cuantificación del porcentaje del área celular ocupada por la señal de 4G8 (ANOVA de una vía, prueba de comparaciones múltiples de Sidak, *p < 0,05; n = 25-48 células por condición).

Este resultado sugiere que la insulina podría potenciar la acumulación intracelular de A β en astrocitos primarios, posiblemente modulando su capacidad de captación o degradación del péptido.

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo respaldan la hipótesis central de que la EA, además de ser una patología neurodegenerativa, involucra alteraciones tempranas en el metabolismo energético cerebral, particularmente en la señalización de insulina, y que estas disfunciones pueden manifestarse incluso en ausencia de un compromiso metabólico periférico marcado. Mediante el uso del modelo murino transgénico PDAPP-J20, caracterizado por la sobreexpresión de la proteína precursora amiloide humana con mutación familiar, demostramos que a los ocho meses de edad estos animales ya presentan signos de resistencia a la insulina a nivel hipocampal, en paralelo con alteraciones funcionales cognitivas y sin evidencia de hiperglucemia ni deterioro hepático en la vía de señalización de insulina. Esta desregulación central temprana, consistente con lo reportado en otros modelos de EA, se asocia a una disminución de los niveles del receptor de insulina y de la fosforilación de Akt, sugiriendo un origen cerebral de la resistencia insulínica. En conjunto, estos datos no solo permiten confirmar los objetivos planteados inicialmente, sino que además refuerzan la idea de que el metabolismo energético cerebral representa una interfaz clave entre neurodegeneración y metabolismo sistémico. A partir de esta base, las siguientes secciones discuten en mayor profundidad los cambios observados a nivel metabólico, funcional y conductual, así como los hallazgos *in vitro* que permiten comprender los mecanismos celulares subyacentes.

Cambios metabólicos en el modelo transgénico PDAPP-J20

Los hallazgos obtenidos en este trabajo revelan que los ratones PDAPP-J20, modelo transgénico de la EA, presentan un perfil metabólico periférico y central alterado, incluso en etapas tempranas de la patología. A nivel sistémico, los animales mostraron niveles plasmáticos de insulina elevados en un contexto de normoglucemia, sin alteraciones evidentes en la señalización insulínica hepática, como lo demuestra la preservación de la fosforilación de Akt. Este patrón, que difiere del observado en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (HFD), donde las alteraciones sistémicas preceden al compromiso cerebral, sugiere que en el modelo PDAPP-J20 la desregulación metabólica podría tener su origen en el sistema nervioso central. En este sentido, la reducción de la fosforilación de Akt y la disminución en los niveles del receptor de insulina observadas en el hipocampo de los animales transgénicos son consistentes con una resistencia a la insulina de origen cerebral, fenómeno reportado como temprano y característico en la EA. En particular, Biessels y Reagan describieron alteraciones en la señalización de insulina en el hipocampo de modelos animales de EA, asociadas a déficit cognitivo y reducción de la fosforilación de IRS-1 y Akt

(Biessels & Reagan, 2015). Por su parte, Reagan et al., utilizando modelos murinos APP/PS1 y 3xTg-AD, reportaron hipofosforilación de Akt y pérdida de sensibilidad a la insulina en hipocampo y corteza, incluso antes de la aparición de placas amiloides, destacando el rol temprano de la resistencia central a la insulina en la progresión de la enfermedad (Reagan et al., 2021).

Los animales transgénicos presentaron niveles de glucemia similares a los no transgénicos. Este hallazgo, asociado al incremento de la insulinemia y a una tendencia hacia un HOMA-IR incrementado, podría reflejar un grado leve de resistencia a la insulina.

A su vez, la tendencia al aumento en los niveles de COX-2 en el páncreas de los ratones PDAPP-J20 podría indicar una fase inicial de disfunción pancreática, posiblemente vinculada a una hipersecreción de insulina. Esto es consistente con estudios previos que proponen un rol patogénico periférico del A β , incluyendo la posibilidad de co-deposición amiloide en el páncreas (Wijesekara et al., 2018).

En este marco, se ha propuesto que el A β periférico actúa como un modulador negativo del eje glucosa-insulina: en condiciones de hiperglucemia sostenida, como las que caracterizan a la DM2, el A β circulante podría llegar a los islotes pancreáticos, interferir con la función secretora de las células β y competir con la insulina por su degradación a través de la enzima IDE (Shigemori et al., 2022). Esto provocaría un agravamiento de la hiperglucemia y la resistencia a la insulina, profundizando el deterioro metabólico. Esta perspectiva aporta nuevas claves para entender los mecanismos compartidos entre la EA y la DM2, y señala posibles *targets* terapéuticos que integren los sistemas metabólico y neurodegenerativo.

Perfil conductual y reactividad glial hipocampal en el modelo transgénico PDAPP-J20

En paralelo con las alteraciones metabólicas, los ratones transgénicos presentaron un perfil conductual caracterizado por un comportamiento de tipo ansioso y deterioro en la memoria espacial. En la prueba de campo abierto, tanto los animales transgénicos como los alimentados con HFD evitaron el centro de la plataforma y recorrieron distancias mayores, lo que sugiere un estado de ansiedad exacerbado. Este comportamiento es compatible con el compromiso temprano de estructuras límbicas, como la amígdala, descrito en estadios iniciales de la EA. En cuanto a la evaluación de la memoria, aunque la prueba de NOL no permitió extraer conclusiones robustas por

la baja preferencia por el objeto desplazado, el laberinto de Barnes sí evidenció un deterioro cognitivo específico: los ratones transgénicos mostraron mayores latencias y distancias para encontrar la meta durante la fase de prueba, a pesar de una curva de aprendizaje conservada. Estos resultados refuerzan la presencia de déficits en la memoria espacial asociados a disfunción hipocampal.

Estos cambios conductuales y metabólicos en el hipocampo del ratón PDAPP-J20 se acompañaron de una mayor reactividad astrogliar, evidenciada por el incremento en el área inmunorreactiva de GFAP y la mayor colocalización S100B/GFAP. Aunque la Tesis se centró en cambios astrogliales, nuestro laboratorio ha caracterizado poblaciones neuronales y alteraciones sinápticas en el mismo modelo transgénico. Por ejemplo, en Gregosa et al. reportamos una reducción significativa de células doublecortin+ en ratones PDAPP-J20 de 8 meses, lo que indica una neurogénesis hipocampal alterada (Gregosa et al., 2019). De manera similar, en Beauquis et al. reportamos una disminución del volumen hipocampal, reducción en la expresión de sinaptofisina y menor densidad y tamaño de neuronas NeuN+, reflejando pérdida sináptica y daño neuronal (Beauquis et al., 2014). Más recientemente, estudios de otros grupos han documentado una disminución en la densidad de espinas dendríticas y reducción del volumen hipocampal CA1 (Wright et al., 2023), lo que respalda aún más la degeneración sináptica en la patología amiloide. Además, trabajos anteriores mostraron un menor volumen hipocampal y disminución en la densidad de sinaptofisina (Galvan et al., 2006), reforzando estos hallazgos.

Estos cambios cognitivos e hipocampales presentes en el modelo PDAPP-J20 dan cuenta de la pertinencia de su utilización como modelo experimental de la EA. Si bien existen modelos como el 3xTGAD que además replica la patología tau, creemos que el modelo PDAPP-J20 es adecuado para el propósito de esta Tesis, ya que reproduce la acumulación de amiloide y los déficits sinápticos y cognitivos relacionados, lo que nos permite centrarnos en los mecanismos impulsados por el amiloide tanto *in vivo* como *in vitro*. Consideramos, además, que todos los modelos murinos disponibles actualmente presentan serias limitaciones a la hora de reproducir completamente la EA, incluyendo tanto las patologías amiloide como tau, así como la neurodegeneración. Cada modelo captura diferentes aspectos de la enfermedad, y la elección depende de la pregunta específica de investigación. Dadas estas consideraciones, pensamos que el modelo PDAPP-J20 sigue siendo una opción válida y focalizada para analizar los efectos relacionados con el amiloide.

Estudios futuros podrían beneficiarse de incluir modelos con patología tau para explorar facetas adicionales de la progresión de la EA.

La combinación de un fenotipo metabólico alterado con déficits cognitivos y conductuales subraya la relevancia del eje insulina-cerebro-comportamiento en el desarrollo de la EA. Consideramos que el modelo PDAPP-J20, al presentar disfunciones metabólicas centrales en ausencia de una insulinoresistencia periférica manifiesta, constituye una herramienta valiosa para investigar los mecanismos mediante los cuales la patología amiloide compromete la señalización insulínica cerebral y su repercusión sobre la función sistémica y conductual.

Implicancias de la resistencia a la insulina cerebral en la enfermedad de Alzheimer

La resistencia a la insulina en el sistema nervioso central constituye una característica distintiva de la EA, especialmente en sus fases iniciales. Como se desarrolló anteriormente, esta disfunción se manifiesta particularmente en el hipocampo, una región clave para la memoria y la regulación energética, notable por su alta densidad de receptores de insulina (Havrankova et al., 1978; Steen et al., 2005b). La señalización insulínica en el cerebro, además de intervenir en la homeostasis glucídica, participa activamente en procesos de plasticidad sináptica y supervivencia neuronal (Kellar & Craft, 2020). Su deterioro ha sido vinculado a una cascada de eventos que compromete progresivamente la función cognitiva y bioenergética.

Diversos mecanismos han sido propuestos para explicar esta resistencia cerebral: desde una reducción en la expresión de receptores, hasta la inhibición de la fosforilación tirosina-específica del IR por fosforilación aberrante en residuos de serina en IRS-1 y Akt, fenómeno inducido por oligómeros de A β (Raimundo et al., 2020). Esta interferencia directa del A β sobre la cascada insulínica genera un bucle patológico, donde el amiloide no solo resulta de la disfunción metabólica, sino que también la perpetúa (Xie et al., 2002b).

En esta Tesis, identificamos una reducción de receptores de insulina en el hipocampo de los ratones transgénicos, fenómeno que se observó también en astrocitos de la línea C6. Esta alteración fue acompañada por una disminución en la activación de Akt en el hipocampo tras el estímulo con insulina, lo cual indica una respuesta deficiente de la vía insulínica a nivel intracelular. Resulta particularmente interesante la disparidad observada entre sexos: mientras que los machos

exhibieron una caída en la fosforilación de Akt, las hembras mantuvieron niveles comparables a los controles. Estas diferencias sugieren una posible vulnerabilidad diferencial sexo-específica frente a la disfunción insulínica cerebral. El estudio del dimorfismo sexual en este contexto resulta especialmente relevante, dada la mayor prevalencia de EA en mujeres y las evidencias que señalan una interacción compleja entre metabolismo, sexo y neurodegeneración. Para abordar mecanísticamente este punto, serán necesarios experimentos de pérdida o de ganancia de función de la señalización por esteroides sexuales y de sus efectos sobre el desarrollo de la EA.

En conjunto, estos hallazgos fortalecen la noción de que la resistencia a la insulina cerebral no solo es un epifenómeno de la EA, sino un componente activo en su desarrollo, con consecuencias tanto a nivel neuronal como en la regulación global del metabolismo energético. Además, el papel diferencial del sexo y la presencia de un fenotipo mixto —resistencia central con compensación periférica— aportan elementos clave para comprender la heterogeneidad clínica y metabólica de la enfermedad.

Modelos animales de resistencia a insulina y Alzheimer

En otros modelos animales de Alzheimer transgénicos (por ejemplo, ratones APP/PS1 o Tg2576) la inducción de resistencia insulínica cerebral (por dieta alta en grasas o estresores metabólicos) empeora la patología amiloide y la neurodegeneración, mientras que revertirla mejora el déficit cognitivo. Por ejemplo, Wakabayashi et al. (2019) demostraron que un modelo de ratón APP transgénico alimentado con dieta alta en grasas desarrolla resistencia a la insulina cerebral, con menor *clearance* de A β y mayor depósito amiloide, efectos que son reversibles al retornar a una dieta normal. En cambio, una mutación genética directa en la vía de la insulina (deficiencia de IRS2) no agravó por sí sola la amiloidosis, sugiriendo que son los factores ambientales/metabólicos (estrés inflamatorio o nutricional) los que vinculan la resistencia insulínica con la patología amiloide.

Otros modelos experimentales apoyan esta conexión: la administración intracerebroventricular de estreptozotocina en ratas reproduce cambios neurodegenerativos característicos de la EA (Grieb, 2016). En estos modelos, la deficiencia de señalización de insulina cerebral conduce al aumento de la fosforilación de tau y de la carga de A β . De forma concordante, en modelos transgénicos de la EA como Tg2576 o PDAPP-J20 se ha observado una disrupción de vías dependientes de ERK/PI3K-Akt asociada a resistencia a la insulina y deterioro de memoria (Lee et al., 2018). A nivel clínico, la asociación epidemiológica entre DM2 y EA está bien documentada (Euser et al., 2010). Estudios de

neuroimágenes encuentran que una mayor resistencia a la insulina periférica (medida por HOMA-IR) se correlaciona con menor captación de glucosa cerebral (FDG-PET) en regiones hipocampales y parietales vulnerables en la EA, así como con mayor depósito de A β (Ferreira et al., 2018). Es decir, pacientes con HOMA-IR alto muestran hipometabolismo cerebral y déficits de memoria asociados (Willette et al., 2015). Adicionalmente, en exosomas neuronales se han detectado marcadores de resistencia insulínica (p-IRS1) elevados años antes del diagnóstico clínico de la EA, lo que sugiere un defecto insulínico cerebral precoz (Yarchoan et al., 2014). En conjunto, estos hallazgos en humanos y en distintos modelos animales refuerzan que la resistencia insulínica cerebral contribuye a la acumulación de A β , la hiperfosforilación de tau y al declive cognitivo en la EA.

Estrategias terapéuticas para mejorar la sensibilidad insulínica cerebral en la enfermedad de Alzheimer

Dada esta interrelación, se han ensayado diversas estrategias farmacológicas y no farmacológicas orientadas a mejorar la señalización de insulina en el cerebro.

Insulina intranasal

La insulina intranasal permite la llegada de la hormona directamente al cerebro evitando efectos hipoglucemiantes dada la baja absorción sistémica. Ensayos clínicos en personas con deterioro cognitivo leve (MCI) o EA han reportado mejoras en la memoria y las funciones ejecutivas tras la administración intranasal de 20 UI dos veces al día por 3 semanas (Craft et al., 2012; Reger et al., 2008) observaron que 20 UI intranasales por 4 meses mejoraron la memoria y preservaron la función evaluada por ADAS-cog (Escala de Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer - Subescala Cognitiva), con cambios favorables en los niveles de A β y tau en líquido cefalorraquídeo. Aunque un estudio a 12 meses (289 pacientes) no halló beneficios cognitivos en respuesta a la insulina intranasal, esto se atribuyó a problemas en el dispositivo de administración (Craft et al., 2020). En general, los ensayos sugieren potencial para la insulina intranasal, especialmente en estadios precoces, y sin efectos adversos sistémicos importantes.

Sensibilizadores insulínicos antidiabéticos clásicos: metformina

La metformina, uno de los fármacos normoglucemiantes más utilizados en el tratamiento de la DM2, mejora la sensibilidad insulínica y activa AMPK, promoviendo la autofagia. En modelos de

Alzheimer, la metformina redujo la carga de A β y tau al aumentar la autofagia lisosomal (degradación de APP y A β) y la fagocitosis microglial (Y. Chen et al., 2021; Xu et al., 2021), además de mejorar la memoria espacial en ratones tratados con STZ y ratones APP/PS1.

Recientemente, un estudio de nuestro laboratorio demostró que la metformina, más allá de su acción normoglucemiante, mostró efectos neuroprotectores en modelos de DM2 (González Pérez et al., 2025). En pacientes diabéticos, su uso se asoció con mejoras en memoria y funciones ejecutivas, mientras que en ratones con dieta alta en grasas redujo la resistencia a la insulina en el hipocampo, incrementó marcadores sinápticos y revirtió la activación microglial y la disfunción autofágica. Estos efectos refuerzan la idea de que la metformina podría tener un rol terapéutico en el deterioro cognitivo asociado a la diabetes y a enfermedades neurodegenerativas.

La metformina se está probando en varios ensayos clínicos por su potencial para ralentizar el deterioro cognitivo en personas con MCI con riesgo de EA (Luchsinger et al., 2025). Los datos preliminares sugieren posibles beneficios en la memoria verbal, pero los estudios se encuentran aún en curso. En contraste, un metaanálisis reciente indicó mayor incidencia de EA en usuarios asiáticos de metformina (Luo et al., 2022). Por lo tanto, se requieren más ensayos clínicos para aclarar su rol.

Dieta y estilo de vida

Las intervenciones dietarias pueden mejorar la sensibilidad cerebral a la insulina y la salud neuronal. Por ejemplo, la restricción calórica intermitente ha demostrado en ratones PDAPP-J20 atenuar los déficits cognitivos y reducir la patología amiloide. En un estudio de nuestro laboratorio (Gregosa et al., 2019) hallamos que ciclos periódicos de restricción alimentaria disminuyeron los niveles de A β y mejoraron la memoria en PDAPP-J20, posiblemente mediante mayor autofagia en astrocitos. Dietas cetogénicas (ricas en cetonas en lugar de glucosa) también han mostrado en humanos mayor captación cerebral de energía alternativa y mejoras cognitivas en Alzheimer temprano (Cunnane et al., 2016).

Cambios inducidos por β -amiloide en astrocitos: señalización insulínica, metabolismo energético y disfunción mitocondrial

Nuestros estudios *in vitro*, realizados tanto en la línea celular astrocitaria C6 como en cultivos primarios de astrocitos murinos, permitieron caracterizar de forma detallada las alteraciones

inducidas por A β sobre la funcionalidad astrocítica, especialmente en lo que respecta a la señalización de insulina, el metabolismo de la glucosa y la integridad mitocondrial.

En primer lugar, encontramos que la exposición a A β comprometió la señalización insulínica. En la línea C6, este efecto se manifestó como una disminución en la captación de glucosa y una tendencia a la reducción en los niveles del IR. Estos resultados fueron complementados en cultivos primarios, donde observamos un fenotipo astrocitario reactivo tras la exposición al péptido: aumento en el tamaño celular, translocación nuclear de NF κ B, sobreexpresión de S100B, disminución de EAAT2 y producción elevada de superóxidos mitocondriales.

A nivel de la vía de señalización de insulina detectamos un incremento en los niveles totales de IR en los astrocitos primarios, junto con una redistribución hacia la membrana plasmática. Este aumento se contrapone con la disminución del IR encontrada en el modelo *in vivo* y probablemente refleja una respuesta compensatoria temprana y autónoma de la célula frente al estrés amiloide agudo. En este sistema simplificado, los astrocitos están aislados de otros tipos celulares del cerebro y, por lo tanto, no experimentan las interacciones celulares y señales presentes *in vivo*. Por el contrario, la disminución del IR observada en los ratones PDAPP-J20 después de 8 meses de patología amiloide representa una respuesta crónica e integrada dentro del entorno multicelular del cerebro, que incluye neuronas, microglía y células endoteliales. La exposición prolongada probablemente desencadena mecanismos de retroalimentación regulatoria más complejos y procesos neuroinflamatorios que resultan en una expresión y señalización reducidas del IR.

En los astrocitos primarios, la fosforilación del IR y de Akt no aumentó en respuesta a la insulina, a menos que se removiera previamente el estímulo con A β . Esta reversibilidad sugiere que el amiloide interfiere directamente con la sensibilidad a la insulina, generando un estado de resistencia similar al observado en el cerebro de pacientes con EA (Moloney et al., 2010c; Talbot et al., 2012).

Este fenómeno podría explicarse, al menos en parte, por mecanismos descritos previamente en modelos de EA, en los cuales la fosforilación en residuos de serina de IRS-1 y Akt actúa como retroalimentación negativa que inhibe la fosforilación tirosina del IR (Boles et al., 2017). Asimismo, se ha reportado que A β y sus oligómeros activan la vía PI3K/Akt en microglía, lo que desencadena la producción de citoquinas inflamatorias (Ito et al., 2006), y que dicha activación puede tener consecuencias duales: promover la neuroprotección o favorecer la apoptosis, según el contexto de señalización involucrado (Morrison et al., 2013). Estos datos sugieren que la activación anómala de

Akt en astrocitos expuestos a A β podría estar participando de una respuesta celular desadaptativa, contribuyendo a la resistencia insulínica observada.

En paralelo, caracterizamos la respuesta metabólica de los astrocitos frente al A β . Observamos un aumento en la captación de glucosa y en la expresión de GLUT1, junto con una mayor acumulación de glucógeno. A nivel funcional, el péptido estimuló la liberación de lactato, un efecto dependiente del tiempo de exposición y del entorno glucídico, lo que refleja un cambio en el flujo energético astrocítico. Estos resultados están en línea con estudios que demuestran que el A β puede inducir un aumento transitorio en la glucólisis en células gliales como mecanismo compensatorio ante la toxicidad (Allaman et al., 2010). La administración de insulina logró revertir estos efectos, normalizando la captación de glucosa y reduciendo la sobreexpresión de GLUT1. Estos efectos estarían mediados por una vía dependiente del IR dado que el efecto de la insulina fue prevenido por el inhibidor de los receptores de insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1R) pero no por el inhibidor específico del IGF1R.

Señalización de insulina e IGF-1 en astrocitos

En el sistema nervioso central, tanto la insulina como el IGF-1 ejercen funciones más allá de su papel clásico en el metabolismo periférico. Estas moléculas, además de atravesar la barrera hematoencefálica, también pueden ser sintetizadas localmente, por ejemplo, en el plexo coroideo (Geffken et al., 2022). Una vez en el parénquima cerebral, interactúan con neuronas y astrocitos a través de sus respectivos receptores (IR e IGF1R), modulando procesos ya mencionados, fundamentales para la homeostasis cerebral.

En las neuronas excitatorias, la insulina regula la fosforilación de los receptores AMPA y NMDA, acción esencial para la plasticidad sináptica y los mecanismos de aprendizaje y memoria (Christie et al., 1999). Además, participa en la vía de señalización Akt–GSK3 β , donde su ausencia o disfunción conduce a la desfosforilación e hiperactivación de GSK3 β , lo que favorece la acumulación de Tau hiperfosforilada y la formación de ovillos neurofibrilares, uno de los marcadores patológicos de la EA (Schubert et al., 2004b).

En los astrocitos, estas rutas de señalización adquieren una relevancia aún mayor debido a su papel central en el soporte metabólico y funcional de las neuronas (García-Cáceres et al., 2016a). La insulina y el IGF-1 regulan en estas células una amplia variedad de procesos: desde la producción y liberación de gliotransmisores, como la glutamina y la D-serina, que modulan la comunicación sináptica (Allaman et al., 2011), hasta el acoplamiento neurovascular, controlando el flujo

sanguíneo y facilitando el paso de nutrientes como la glucosa y el lactato desde la circulación hacia el tejido cerebral (Magistretti & Allaman, 2018). La disrupción de estas funciones, particularmente en contextos de resistencia a la insulina o de alteraciones en la señalización del IGF-1, representa un mecanismo potencialmente clave en la fisiopatología de trastornos neurodegenerativos como la EA.

Efecto de la exposición de astrocitos a A β sobre la bioenergética mitocondrial

La exposición al A β también tuvo un impacto marcado sobre la bioenergética mitocondrial. Aunque no se observaron cambios evidentes en el número o morfología de las mitocondrias, sí detectamos una reducción en el potencial de membrana y un patrón de fragmentación mitocondrial, lo que sugiere un deterioro funcional precoz. Las mediciones del potencial de membrana son consideradas un indicador sensible de la salud mitocondrial utilizado en la investigación de la EA (Swerdlow et al., 2010). Publicaciones recientes destacan al potencial de membrana mitocondrial como un biomarcador temprano relevante de la disfunción mitocondrial en la EA, reflejando alteraciones en la actividad de la cadena de transporte de electrones y el estrés oxidativo (Monzio Compagnoni et al., 2020). Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial se correlacionan con la producción deficiente de ATP y la disfunción de la cadena respiratoria en modelos de EA (Reddy & Beal, 2008). Aunque una caracterización bioenergética más completa fortalecería los hallazgos, nuestros datos actuales proporcionan evidencia del deterioro mitocondrial asociado con la patología amiloide *in vitro*.

Estos efectos se acompañaron de una reducción en el tamaño de las gotas lipídicas, revertida por el inhibidor de la β -oxidación etomoxir. Este resultado, junto con la disminución del potencial de membrana asociada al tratamiento con etomoxir, sugiere una mayor dependencia de la oxidación de ácidos grasos como fuente energética en condiciones de estrés mitocondrial. Esta adaptación podría interpretarse como una respuesta compensatoria para sostener el potencial mitocondrial y la producción de ATP en un contexto de disfunción glucolítica (Camandola & Mattson, 2017). En este sentido, la señalización de insulina parece jugar un rol protector, ya que su aplicación restauró parcialmente el potencial de membrana mitocondrial y la capacidad de liberación de lactato.

No obstante, también observamos que la insulina aumentó la acumulación intracelular de A β , lo cual podría deberse a una interferencia en las vías de degradación, como la inhibición de la IDE, responsable tanto de la degradación de insulina como de A β (Qiu et al., 1998; Zhao et al., 2008) o a la promoción del uptake de amiloide mediada por el IR (W. Chen et al., 2023). Este hallazgo refuerza

la idea de que, en contextos de resistencia insulínica, los astrocitos podrían perder su rol en el *clearance* del A β , el cual podría acumularse extracelularmente y exacerbar la patología.

En conjunto, nuestros datos indican que el A β promueve una reprogramación metabólica e inflamatoria en los astrocitos, alterando tanto la captación y procesamiento de glucosa como la dinámica mitocondrial, y afectando de forma significativa la señalización de insulina. La insulina, a su vez, exhibe un papel dual: por un lado, atenúa algunos de los efectos deletéreos del A β sobre la función mitocondrial y el metabolismo energético; por otro lado, en condiciones de hiperinsulinemia y defectos en su señalización, podría contribuir a la acumulación de amiloide. Estos resultados ponen de manifiesto la compleja interacción entre metabolismo, inflamación y neurodegeneración, y posicionan a los astrocitos como nodos clave en la fisiopatología de la EA.

Activación astrogliar e insulinoresistencia en la enfermedad de Alzheimer

En el modelo PDAPP-J20 y en cultivos primarios expuestos a A β se observó un aumento sostenido de marcadores de astrogliosis, como GFAP y S100B. Esto concuerda con la noción de que los astrocitos hiperreactivos pierden sus funciones de soporte y adoptan un fenotipo neurotóxico (denominado astroglia A1, Lawrence et al., 2023) en respuesta a señales inflamatorias del microambiente cerebral. Es sabido que factores liberados por la microglía activada (p.ej. TNF- α , IL-1 β y C1q) inducen un fenotipo A1, en el cual los astrocitos pierden su capacidad de promover la supervivencia neuronal y comienzan a secretar componentes del complemento (C3) y citoquinas proinflamatorias. En este sentido, la elevada expresión de NF κ B observada en nuestros astrocitos en cultivo sugiere un estado proinflamatorio glial. El factor de transcripción NF κ B es el regulador maestro de la respuesta inflamatoria: su activación en astrocitos induce expresión de quimioquinas (p.ej. CXCL10) y otros mediadores inflamatorios. Paradójicamente, algunos estudios recientes indican que la activación transitoria de la vía IKK2/NF κ B en astrocitos puede facilitar la polarización de la microglía hacia un fenotipo fagocítico capaz de degradar A β , reduciendo la carga amiloide en modelos experimentales (S. Yang et al., 2021). Esto sugiere que la señalización inflamatoria astrogliar puede tener efectos duales: beneficiosos en etapas tempranas y perjudiciales si esta se mantiene en el tiempo.

En esta Tesis, se pone en evidencia que la activación proinflamatoria astrocitaria coexiste con alteraciones funcionales deletéreas: entre ellas la pérdida del transportador de glutamato EAAT2. Estudios previos han mostrado que los oligómeros de A β reducen la expresión de EAAT2 en astrocitos mediante vías dependientes de calcineurina/NFAT y estrés oxidativo (Abdul et al., 2009;

Scimemi et al., 2013). La menor presencia de EAAT2 en astrocitos hipocámpales podría traducirse en acumulación de glutamato extracelular y contribuir a la excitotoxicidad.

Simultáneamente, nuestros resultados demuestran una alteración de la señalización insulínica en los mismos astrocitos reactivos: a pesar de un aumento de la expresión total de los IR, su fosforilación activadora se encontró reducida, lo cual podría indicar resistencia insulínica. En condiciones fisiológicas, la insulina promueve el almacenamiento de glucógeno astrogial, estimula la captación de glucosa vía GLUT1 y modula respuestas inflamatorias (Arnold et al., 2018; Heni et al., 2011). Así, al desviar energía hacia la reparación y al activar rutas anabólicas, la señal insulínica protege el entorno neuronal. Al contrario, la resistencia a la insulina reduce la generación de ATP astrogial y compromete el *clearance* de A β . De hecho, Chen et al., evidenciaron que la eliminación del receptor de insulina en astrocitos de ratones 5xFAD (un modelo de EA agresivo) empeoró la memoria y aceleró la patología: hubo más fosforilación de tau, placas amiloides de mayor tamaño y menor captación de A β . *In vitro*, astrocitos sin IR mostraron una marcada caída en producción de ATP y capacidad glucolítica, así como disminución de captación de A β basal y estimulada por insulina (W. Chen et al., 2023).

En esta Tesis también se demuestra una recuperación parcial de la señal de Akt tras remover A β , lo que apoya la idea de que A β por sí mismo induce esta insensibilidad insulínica en astrocitos. En otras palabras, la exposición crónica a A β podría inhibir la cascada PI3K/Akt/FoxO en astrocitos, favoreciendo la acumulación ROS y perpetuando la inflamación. De hecho, se ha reportado que la resistencia a la insulina en el cerebro se asocia con mayor producción de ROS y deterioro mitocondrial (Sripetchwandee et al., 2018). Así, el círculo vicioso entre astrocitos hiperreactivos, que producen ROS y citoquinas, y la falla en la señal insulínica, que a su vez incrementa el estrés oxidativo y la neurotoxicidad, parece contribuir al declive metabólico observado en las primeras fases de la EA.

Metabolismo glucídico astrogial en AD

La neuroinflamación y la activación glial, tal como ocurren en la EA, se asocian frecuentemente a alteraciones metabólicas. Los astrocitos reactivos son capaces de incrementar la captación de glucosa y liberar lactato (Pamies et al., 2021; Salvadó et al., 2022), como se observa en nuestro estudio. Análisis proteómicos del líquido cefalorraquídeo han revelado que, en etapas tempranas de la EA, se enriquece un módulo metabólico vinculado al azúcar junto con marcadores de

activación glial (E. C. B. Johnson et al., 2020). En nuestros experimentos, los astrocitos expuestos a A β mostraron un aumento en la captación de glucosa, una elevación en la expresión del transportador GLUT1 y una acumulación mayor de glucógeno, evidenciando así una respuesta metabólica que acompaña a la activación inflamatoria. A nivel funcional, el A β estimuló la liberación de lactato en un tiempo de incubación de 2 horas, aunque este efecto se vio atenuado cuando los astrocitos fueron expuestos al amiloide por 24 h o incubados en un medio con alta disponibilidad de glucosa (17,5 mM). Estos hallazgos sugieren que, si bien el amiloide puede funcionar como una señal a corto plazo que favorece la supervivencia neuronal en condiciones de escasez, su exposición crónica –o la presencia de altos niveles de glucosa, como en la diabetes– puede desencadenar un déficit metabólico que agrave la patología amiloide (R. J. Johnson et al., 2023; H. Zhang et al., 2022). Aunque el lactato es un sustrato energético esencial para las neuronas, su liberación excesiva por parte de los astrocitos podría resultar perjudicial. De hecho, se ha demostrado que los niveles regionales de lactato, considerados como un *proxy* de la actividad neuronal, se asocian con la presencia local de A β (Bero et al., 2011), sugiriendo que un aumento en la glucólisis puede potenciar los efectos patogénicos del amiloide y resaltando la importancia de una regulación fina y constante de sus niveles en el sistema nervioso.

Estudios longitudinales en pacientes con EA familiar indican que la astrogliosis y el aumento en el metabolismo glucídico son eventos tempranos que preceden, por varios años, la aparición de una patología amiloide manifiesta y del deterioro cognitivo (Carter et al., 2019; Fontana et al., 2023). Conforme avanza la enfermedad, tanto la astrogliosis como el metabolismo de la glucosa disminuyen (Rodríguez-Vieitez et al., 2016), lo que resalta la importancia de la respuesta astrogliar en la fisiopatología de la EA. De manera similar, estudios recientes han mostrado que los astrocitos derivados de iPSC de pacientes con EA familiar presentan déficits metabólicos y gliosis más marcados que los astrocitos de control expuestos agudamente a A β (Elsworthy et al., 2025), lo que evidencia la complejidad y la dinámica dependiente del tiempo de la respuesta astrogliar en la EA.

Efectos de la insulina en el metabolismo glucídico de los astrocitos

Captación de glucosa y manejo del glucógeno en astrocitos

Diversos hallazgos indican que la señalización astrocitaria de insulina e IGF-1 modula la expresión y translocación de transportadores como GLUT1 y GLUT4, amplificando la capacidad astrogliar para responder a demandas metabólicas fluctuantes (Nijland et al., 2014). Una alteración de estas vías,

como ocurre en la resistencia a la insulina cerebral, afecta la provisión de lactato neuronal y compromete la actividad sináptica y la plasticidad.

Aunque la captación de glucosa en astrocitos depende principalmente de GLUT1, se ha identificado recientemente la expresión de GLUT4 en estas células, sugiriendo que la insulina podría influir indirectamente en el almacenamiento de glucógeno y la distribución de sustratos. Experimentos en cultivos de astrocitos de roedor revelaron que insulina e IGF-1 estimulan la acumulación de glucógeno (García-Cáceres et al., 2012; Muhič et al., 2015). Asimismo, estudios más recientes en astrocitos primarios humanos han identificado que, tras la unión de insulina o IGF-1 a sus receptores, se activan las vías IRS-1-PI3K-Akt y Shc-Ras-MAPK, modulando rápidamente la actividad de proteínas implicadas en la biogénesis ribosomal, la autofagia y la biosíntesis de colesterol, entre otras. La señalización de insulina e IGF-1 en astrocitos no solo regula la homeostasis energética celular, sino que también ejerce un control transcripcional de largo plazo sobre rutas metabólicas críticas, resaltando su importancia en la homeostasis proteica y la respuesta al estrés (Geffken et al., 2022).

Otras observaciones sugieren que el efecto de la insulina sobre la captación de glucosa astrogliar puede depender de la dosis y el tiempo de exposición: concentraciones agudas de insulina potencialmente aumentan la captación a través de las rutas mencionadas, mientras que niveles crónicamente elevados pueden inducir resistencia insulínica astrogliar. De hecho, en condiciones de exceso de insulina se han visto mecanismos de retroalimentación negativa; por ejemplo, en cultivos de astrocitos de ratón se encontró que la exposición prolongada a niveles elevados de insulina atenúa su señalización, ocurriendo esto en menor medida en neuronas (Beard et al., 2022a; Clarke et al., 1984). Este efecto podría explicar que, en escenarios crónicos como en la progresión de la EA, la sobreexpresión inicial de IR en astrocitos —quizá como respuesta adaptativa al déficit energético— eventualmente se pierde debido a la instauración de resistencia insulínica. De hecho, estudios en cerebros humanos *post mortem* de pacientes con EA han encontrado niveles disminuidos de insulina e IR en el tejido cerebral (Chiu et al., 2008; Steen et al., 2005b; Talbot et al., 2012). Una interpretación plausible es que una exposición sostenida al A β podría desencadenar una hiperactivación inicial del sistema insulínico astrogliar (incrementando la expresión de IR para contrarrestar el estrés metabólico), seguida de un agotamiento progresivo de la señalización de la insulina, lo cual se correspondería con la caída reportada de IR en estadios avanzados de la enfermedad (Beard et al., 2022a).

Los resultados de nuestro modelo experimental concuerdan con otras evidencias. (Allaman et al., 2010) mostraron que la exposición de astrocitos a A β (fragmentos 25-35 o 1-42) induce un marcado incremento en la captación de glucosa y su metabolización, incrementando la producción de lactato, actividad de la vía glucolítica, ciclo de Krebs y vía de las pentosas fosfato. Estos efectos fueron dependientes de la integridad de la vía de PI3K, lo que sugiere que el A β puede activar rutas de señalización similares a las de la insulina, al menos en etapas agudas.

En paralelo, estudios de medicina regenerativa con astrocitos humanos derivados de iPSC expuestos a A β han mostrado disrupciones mitocondriales (aumento inicial de fusión mitocondrial seguido de fisión excesiva y disminución funcional) y un cambio metabólico que favorece la glucólisis y la β -oxidación peroxisomal (Zyśk et al., 2023). Nuestros datos, que muestran una restauración parcial de la funcionalidad mitocondrial y de la liberación de lactato tras la exposición a insulina, sugieren que esta hormona conduce a los astrocitos hacia un metabolismo más equilibrado, reduciendo el estrés oxidativo inducido por A β (en consonancia con el aumento de NADH observado en otros estudios de señalización insulínica astrogial; Beard et al., 2022b). Asimismo, Hendrix et al., (2021) reportaron que el A β_{1-42} perturba el tráfico de GLUT1, reduciendo su presencia en la membrana plasmática de astrocitos de ratón y humanos, lo que correlaciona con hipometabolismo cerebral en AD. Nuestros hallazgos de normalización de GLUT1 por insulina indican que la insulina puede contrarrestar estos efectos de A β , estabilizando la localización de GLUT1 a nivel de la membrana, lo que coincide con la idea de que una señal insulínica adecuada es esencial para la integración de GLUT1 en la membrana astrogial (Fernandez et al., 2017).

A nivel de modelos animales y en humanos, se han descrito fenómenos análogos. Recientemente, Chen et al., (2023) diseñaron ratones 5xFAD, modelo de EA, con una delección selectiva e inducible del IR en astrocitos (iGIRKO). Estos animales mostraron empeoramiento de la conducta y de la patología: mayor fosforilación patológica de tau, placas de A β de mayor tamaño y más interacción de astrocitos con depósitos amiloides comparados con 5xFAD normales. En cultivos de astrocitos primarios, la eliminación de IR provocó pérdida de la señalización insulínica, menor producción de ATP, menor capacidad glucolítica e incapacidad para internalizar A β tanto en condiciones basales como tras la estimulación con insulina. Esto corrobora que la señalización insulínica astrogial protege frente a la acumulación de A β y además sostiene el metabolismo energético: la falta de IR no solo redujo directamente la glucólisis y la respiración mitocondrial, sino que también empeoró la captación de A β por parte de los astrocitos, creando un círculo vicioso que agrava la patología.

Finalmente, proponemos la hipótesis de que el fenómeno que observamos de sobreexpresión de IR inducida por A β podría reflejar una etapa inicial de “hipersensibilización” astrogliar. En un escenario agudo, la acumulación de A β podría “forzar” a los astrocitos a expresar más IR e incrementar la captación de glucosa como una respuesta compensatoria para afrontar el estrés amiloide. Sin embargo, ante la persistencia del estímulo patológico, esta sobreexpresión sería insostenible: la exposición crónica a A β y la propia resistencia insulínica inducida probablemente conducirían a la internalización y degradación del receptor. Este modelo sería compatible con estudios que reportan niveles reducidos de insulina, IR y sus sustratos de señalización (p.ej. IRS-1) en cerebros de pacientes con EA en fases avanzadas (Chiu et al., 2008; Steen et al., 2005b; Talbot et al., 2012).

Acción de la insulina sobre el metabolismo energético astrogliar

La exposición a A β alteró el potencial de membrana mitocondrial en los astrocitos, señal de un cambio en la dinámica y funcionalidad mitocondrial. Aunque la insulina no revirtió los cambios en el tamaño y número de mitocondrias, sí restauró el potencial de membrana, lo que se correlacionó con la recuperación en la capacidad de liberación de lactato. Estos hallazgos evidencian una reconfiguración en la dinámica metabólica y la función mitocondrial en respuesta al A β . De forma adicional, los astrocitos expuestos al A β mostraron una mayor dependencia de la oxidación de ácidos grasos, como se deduce de la reducción en la densidad de gotas lipídicas y la disminución del potencial de membrana tras el tratamiento con el inhibidor de CPT1, etomoxir. Se ha documentado que los astrocitos con señalización insulínica deteriorada incrementan la oxidación de ácidos grasos –un proceso asociado a la sobreexpresión de CPT1c y a un aumento en el consumo de oxígeno (García-Cáceres et al., 2016b; Mächler et al., 2016)– lo que puede resultar en un déficit energético incapaz de satisfacer las necesidades neuronales. En este sentido, las disfunciones mitocondriales y metabólicas podrían contribuir de manera causal al desarrollo de la neuroinflamación y la neurodegeneración, y la modulación de la señalización insulínica podría representar una nueva estrategia terapéutica.

Gotas lipídicas y metabolismo energético astrogliar

En condiciones patológicas, los astrocitos acumulan gotas lipídicas (LD) como depósitos de triacilglicéridos y ácidos grasos (AGs; Smolič et al., 2021b). Estas LDs, formadas en el retículo endoplásmico, sirven de reservorio energético: cuando la célula requiere combustible, sus

triglicéridos se hidrolizan liberando AGs que luego son transportados a las mitocondrias para la β -oxidación (Bazinet & Layé, 2014; Cerasuolo et al., 2024). Nuestra observación de que el A β reduce el almacenamiento de lípidos en astrocitos privados de suero probablemente refleja la corta duración de la exposición en nuestro ensayo y se asocia a una respuesta metabólica temprana. En contraste, los estudios que reportan acumulación de LD inducida por el A β suelen involucrar tiempos de exposición más prolongados o condiciones crónicas, durante las cuales las LD se acumulan progresivamente cerca de las mitocondrias como una respuesta patológica. Además, la disponibilidad de nutrientes y la fase metabólica influyen críticamente en la dinámica de las gotas lipídicas. Bajo privación de suero, las células pueden movilizar las reservas lipídicas de manera diferente, y la exposición aguda al A β podría inicialmente inducir la utilización de los lípidos como fuente energética antes de promover más tarde la acumulación de LD como parte de un proceso de adaptación al estrés o disfunción.

En nuestro experimento, el A β indujo un cambio metabólico caracterizado por mayor liberación de lactato y dependencia de la β -oxidación, probablemente debido a una disfunción mitocondrial.

Aun comprometida su funcionalidad, las mitocondrias pueden mantener parcialmente su capacidad de oxidar ácidos grasos como fuente alternativa de energía cuando la glucólisis o la entrada de piruvato están alteradas. Esta adaptación permite sostener la producción mínima de ATP necesaria para funciones celulares básicas, incluso en condiciones de estrés o daño mitocondrial, promoviendo un uso compensatorio de LDs como fuente de combustible.

Conclusiones

Conclusiones

Nuestros hallazgos resaltan la compleja interacción entre el metabolismo glial, la señalización insulínica y la patología amiloide en la progresión de la EA (Fig. 71).

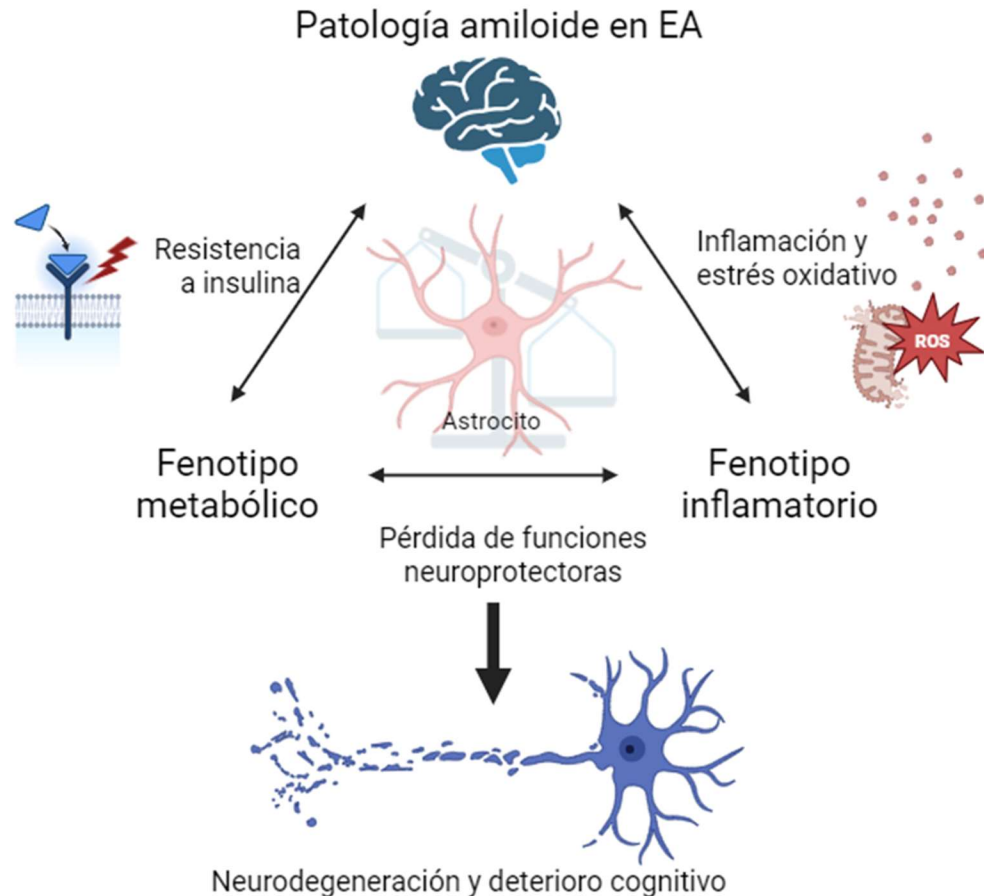


Figura 71. La patología amiloide experimental induce respuestas metabólicas y gliales simultáneas, que podrían influir en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer (EA). La presencia de patología amiloide puede desencadenar tanto un fenotipo metabólico, caracterizado por una señalización de insulina alterada, como un fenotipo inflamatorio, marcado por estrés oxidativo y translocación de NFκB en astrocitos. Estos fenotipos de desbalance homeostático pueden interactuar, conduciendo a la pérdida de funciones neuroprotectoras, neurodegeneración y, finalmente, deterioro cognitivo.

El cambio en la función metabólica de los astrocitos parece orquestar tanto la respuesta inflamatoria como los aspectos fisiopatológicos de la neurodegeneración. A pesar de que han transcurrido más de cien años desde la descripción inicial de la EA, las estrategias terapéuticas actuales continúan siendo ineficaces, en parte debido a la complejidad del estado cerebral en las

Conclusiones

enfermedades neurodegenerativas y a la falta de modelos experimentales que reproduzcan fielmente la patología. Dado que el daño cerebral en un cerebro envejecido es en gran medida irreversible, la restauración funcional se plantea como objetivo terapéutico primordial. En este contexto, estrategias que busquen potenciar o restablecer la energética cerebral y glial, como el tratamiento con insulina, podrían tener un impacto positivo en la progresión de la enfermedad. Además, la modulación de la señalización insulínica podría ser una opción para reposicionar fármacos en el ámbito de la neurodegeneración. No obstante, como se ha discutido, la variabilidad en el estado metabólico a lo largo de las distintas etapas de la EA debe considerarse cuidadosamente para determinar la efectividad de las estrategias terapéuticas basadas en la vía de señalización de la insulina.

Materiales y Métodos

Materiales y métodos *in vivo*

Animales y grupos experimentales

En nuestro estudio utilizamos ratones adultos transgénicos (Tg) PDAPP-J20 (PDGFB-APPSwInd), tanto machos como hembras, junto con sus hermanos no transgénicos (NTg). Estos animales fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET; Certificado de Garantía del NIH # A5072-01), y los reproductores nos fueron proporcionados por la Dra. Verónica Galván de la Universidad de Oklahoma, Health Sciences Center, EEUU. Dichos ratones portan el gen humano de la proteína precursora del amiloide (APP) con las mutaciones *Swedish* e *Indiana*, asociadas a la EA familiar, y fueron generados mediante el cruzamiento de machos Tg hemicigotas con hembras de la cepa C57BL/6J (Jackson Lab.) (Mucke et al., 2000). Realizamos la genotipificación de los ratones Tg mediante PCR utilizando *primers* específicos para el gen APP humano, mientras que utilizamos los ratones NTg como grupo control.

Además, alimentamos a un grupo experimental de ratones NTg con una dieta alta en grasas (HFD del inglés *high-fat diet*). En este alimento, el 45% de las kilocalorías provienen de la grasa, mientras que en la dieta control (CD) es de un 12%. El grupo de ratones HFD fue incluido con el objetivo de establecer un grupo control positivo para el desarrollo de resistencia a la insulina (Fig. 72).

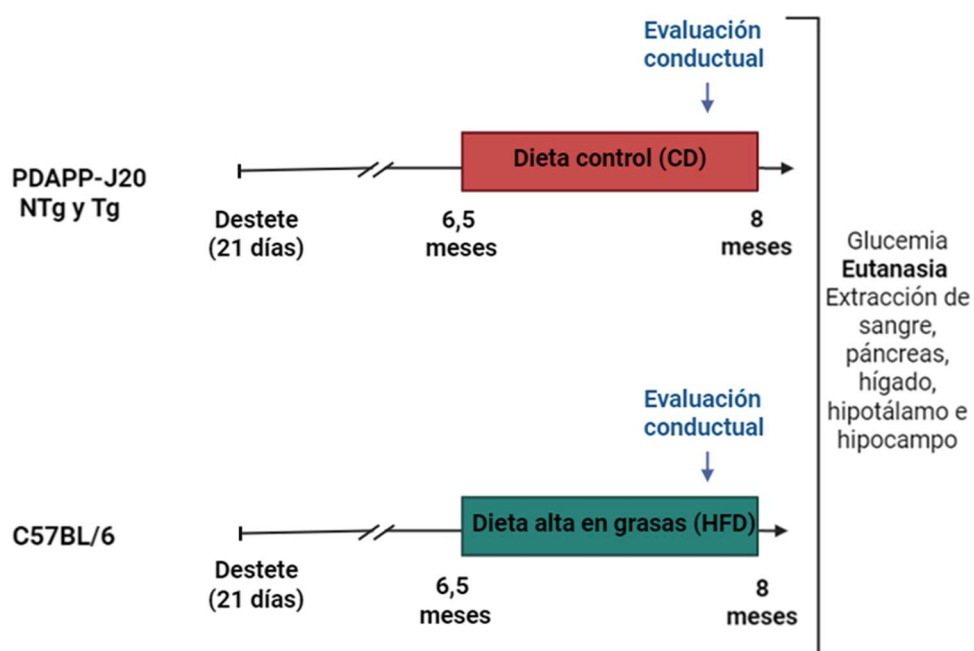


Figura 72. Diseño experimental *in vivo*. Se evaluaron parámetros metabólicos y conductuales en ratones transgénicos PDAPP-J20 (Tg), controles no transgénicos (NTg), y alimentados con una dieta alta en grasas (HFD) durante 1,5 meses, machos y hembras, de 8 meses de edad.

Tanto la CD como la HFD fueron proporcionadas por GepaFeeds (Grupo Pilar, Pilar, Buenos Aires, Argentina). La composición de las dietas se detalla en la Tabla 1 y en particular la composición lipídica de la HFD en la Tabla 2.

Dieta	CD	HFD
Energía	2.5 Kcal/g	3.9 Kcal/g
Carbohidratos	28.8%	22.5%
Proteínas	25.5%	22.8%
Grasa	3.6%	21.1%
Fibras	27.4%	23.0%
Minerales	8.1%	5.6%
Humedad	6.7%	5.0%

Tabla 1. Composición nutricional de las dietas control (CD) y alta en grasas (HFD) suministradas a los ratones. Los porcentajes se expresaron respecto al peso del alimento.

HFD: Ácidos grasos principales	
Monoinsaturados	44.7%
Saturados	29.8%
Poliinsaturados	20.9%

Tabla 2. Composición de los principales ácidos grasos presentes en la dieta HFD.

En primer lugar, criamos a los ratones en sus respectivas jaulas, separándolos por sexo al momento del destete. A partir de los 6,5 meses de edad, asignamos a un subgrupo de estos animales NTg para que recibiera la dieta HFD, manteniendo esta alimentación de forma continua hasta completar los 8 meses de edad, cuando finalizó el protocolo experimental. Durante este periodo de 5 semanas, registramos sistemáticamente la cantidad de alimento consumido por cada jaula, lo que nos permitió monitorear el consumo alimentario y evaluar las posibles variaciones entre los grupos. Además, pesamos a los animales tanto al inicio del protocolo como inmediatamente antes de la eutanasia, con el fin de determinar el impacto de la dieta en su peso corporal y en el desarrollo de la resistencia a la insulina.

Los animales se mantuvieron en grupos de 3 a 5 individuos por jaula, en condiciones de humedad y temperatura controladas, y bajo un ciclo estándar de luz y oscuridad, con el encendido de la luz a las 7 de la mañana. Todos los experimentos se realizaron siguiendo la Guía del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011) y contaron con la aprobación del CICUAL del Instituto de Biología y Medicina Experimental (protocolos #24/2019 y #23/2023). Nos esforzamos por reducir al mínimo el número de animales empleados y por minimizar su sufrimiento y malestar.

Evaluaciones comportamentales

Evaluación de la conducta de tipo ansiosa: Prueba de campo abierto

La prueba de exploración en un campo abierto (*open-field*, OF) se llevó a cabo para evaluar la conducta exploratoria. El dispositivo utilizado consistió en una plataforma de madera revestida con melamina blanca de 55 x 55 cm² de área con paredes de 25 cm de altura (Fig. 73). Los animales fueron colocados individualmente en el centro de la arena y se evaluó su conducta exploratoria durante 5 minutos, a partir de archivos de video. Se determinó una región central de la plataforma digitalmente teniendo en cuenta un área central de 15 x 15 cm. En este trabajo de tesis se muestran las variables distancia total recorrida y distancia recorrida en el centro, evaluadas utilizando el software EthoWatcher.

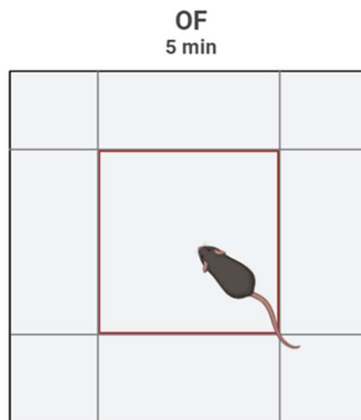


Figura 73. Esquema de la plataforma de la prueba de campo abierto (open-field, OF).

Evaluación de la memoria espacial: Prueba de Barnes

Para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial a largo plazo, empleamos el laberinto de Barnes siguiendo el protocolo de Sunyer et al. (2007). El dispositivo consiste en una plataforma circular blanca de 85 cm de diámetro, iluminada y elevada 70 cm sobre el suelo, con 20 orificios equidistantes en su perímetro; uno de ellos, elegido como “target”, comunica con una caja oscura que actúa como refugio (Fig. 74).

Durante la fase de entrenamiento (días 1 a 4), cada ratón fue sometido a cuatro ensayos diarios. En cada uno, colocamos al animal en el centro de la plataforma y registramos la latencia hasta que exploraba libremente y encontraba el orificio target, acceso que marcaba el fin del ensayo al

ingresar a la caja oscura. Este diseño permite medir día a día la mejora en la capacidad de localizar la vía de escape.

Luego de 24 h después del último entrenamiento, iniciamos la prueba. Retiramos la caja de escape y permitimos que el ratón explorara la plataforma durante 180 s. Durante este tiempo, cuantificamos la distancia recorrida hasta el orificio previamente señalado y la latencia para alcanzarlo. Un desplazamiento corto y una baja latencia reflejan una adecuada retención de la ubicación aprendida durante los ensayos de entrenamiento.

De este modo, el laberinto de Barnes nos proporciona una evaluación integrada de adquisición y consolidación de la memoria espacial, diferenciando entre el proceso de aprendizaje y la capacidad de retención a largo plazo.

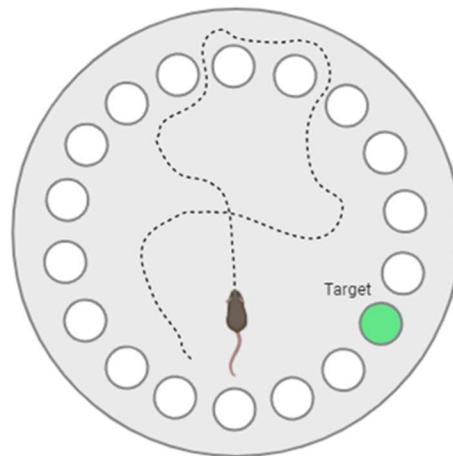


Figura 74. Esquema representativo de la plataforma de la prueba de Barnes.

Medición de peso corporal, glucemia y procedimiento de eutanasia

Al finalizar el protocolo experimental, a los 8 meses de edad, registramos el peso corporal y la glucemia basal de los animales tras un ayuno de 6 horas. La glucemia fue determinada a partir de una gota de sangre obtenida mediante una pequeña incisión en la punta de la cola, utilizando un glucómetro portátil (One Touch Ultra, Johnson & Johnson, Argentina).

Posteriormente, anestesiámos a los animales con una combinación de ketamina (80 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) por vía intraperitoneal, y procedimos a realizar una extracción de sangre del seno venoso maxilar, recolectando una muestra de suero.

A continuación, administramos insulina por vía intraperitoneal (5 UI/kg; Laboratorio Beta, Argentina) con el objetivo de inducir de forma general la activación de la vía de señalización insulínica. Diez minutos después de la administración, realizamos la eutanasia por decapitación y recolectamos la sangre troncal para obtener una segunda muestra de suero (S1).

Cuantificación de insulina sérica por radioinmunoensayo y prueba HOMA-IR

Determinamos los niveles de insulina en suero mediante un ensayo de radioinmunoensayo (RIA). Las muestras de suero fueron obtenidas a partir de sangre extraída del seno venoso maxilar y de sangre troncal tras la administración de insulina, como se describe en la sección anterior.

El ensayo se realizó utilizando un protocolo ya publicado (Di Giorgio et al., 2023). Brevemente, el principio del ensayo se basa en la competencia entre la insulina endógena presente en la muestra y una insulina marcada radioactivamente con iodo-125 (^{125}I), por un número limitado de sitios de unión en un anticuerpo específico anti-insulina (Sigma, EEUU). La insulina porcina humanizada para la yodación y el estándar fueron proporcionados por Laboratorios Beta (Argentina).

Mezclamos las muestras de suero con el trazador radiactivo y el anticuerpo en tubos de ensayo, y luego incubamos las mezclas durante el tiempo recomendado, permitiendo la unión competitiva. A continuación, se precipitaron los complejos antígeno-anticuerpo, separándolos de la insulina libre. Posteriormente, se realizó una centrifugación para aislar el precipitado.

La radioactividad de los complejos ligados fue medida utilizando un contador gamma, y la concentración de insulina en cada muestra fue determinada mediante interpolación en una curva estándar generada a partir de concentraciones conocidas. La concentración mínima detectable fue de 2 ng, y el coeficiente de variación intraensayo fue del 6,8%.

Los resultados se expresaron en ng/mL y, cuando fue necesario, se convirtieron a $\mu\text{U/mL}$ para la prueba HOMA-IR. A partir de los valores de glucemia e insulinemia en ayunas, calculamos el valor HOMA-IR como estimador de la resistencia a la insulina realizando el siguiente cálculo:

$$HOMA - IR = \frac{Glucemia \left(\frac{mmol}{L} \right) * Insulinemia \left(\frac{\mu U}{L} \right)}{22,5}$$

Procesamiento del tejido

Como se mencionó anteriormente, luego de la eutanasia, se extrajo el cerebro y el hemisferio derecho se colocó en paraformaldehído (PFA) 4% como fijador. Luego de 24 h se removió el PFA y los cerebros permanecieron en PBS 1X a 4 °C hasta su procesamiento. Se realizaron cortes coronales de 60 µm de espesor con un vibrátomo PELCO EasySlicer obteniéndose 48 secciones de cerebro por ratón, abarcando toda la extensión del hipocampo. Los cortes se colocaron en solución crioprotectora (Composición: 250 mL de glicerina, 300 mL de etilenglicol, 500 mL de PBS 1X) y se mantuvieron a -20°C hasta la realización de análisis histológicos. El hemisferio cerebral izquierdo se destinó a determinación de proteínas por Western blot.

El páncreas se extrajo rápidamente, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80 °C hasta su uso para la determinación del contenido de insulina.

Consideramos una limitación de este análisis que los ensayos de Western blot en tejido pancreático fueron realizados solamente en ratones macho. En el momento en que llevamos a cabo este análisis, habíamos centrado el enfoque experimental exclusivamente en los machos con el objetivo de simplificar la cantidad de grupos a estudiar en los análisis histológicos. No obstante, en estudios posteriores encontramos diferencias sexo-específicas relevantes, lo cual nos motivó a incluir a las hembras en las evaluaciones histológicas. Sin embargo, para ese entonces el análisis de Western blot ya había sido completado y no disponíamos del material necesario para repetir la técnica en hembras.

Western Blot de tejido

El tejido congelado de hipocampo, hipotálamo e hígado fue homogeneizado en buffer RIPA suplementado (en una relación tejido: buffer de 1:10), utilizando un sonicador. La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método estandarizado de Bradford y luego de la lisis con buffer de carga 5x, fueron sembradas en geles de acrilamida 10%, separadas electroforéticamente por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Los sitios inespecíficos de las membranas fueron bloqueados con leche descremada en polvo en buffer TBS con detergente

Tween-20 al 0.5% (TTBS). Para evaluar los niveles de las proteínas de interés, las membranas fueron incubadas a 4° C durante 18-24 h con los anticuerpos primarios correspondientes. Luego, las membranas fueron adecuadamente lavadas en soluciones TTBS 0.5% y TBS, incubadas durante una hora con diluciones 1:1000 de los anticuerpos secundarios especie-específicos conjugados a HRP. La inmunoreactividad fue revelada mediante la reacción con los reactivos ECL (luminol y ácido p-cumárico; Sigma-Aldrich, EEUU) por 3 minutos, seguido de la exposición inmediata en el sistema Chemi gel doc G-Box (Syngene, Reino Unido).

La densidad óptica de las bandas correspondientes a los pesos moleculares específicos de las proteínas de interés fue cuantificada utilizando el *plug-in* del software ImageJ para análisis de geles.

Inmunofluorescencia en tejido

Se seleccionaron los cortes a utilizar y se removió la solución crioprotectora realizando 2 lavados con PBS de 5 minutos. Se incubó con buffer citrato 0,01 M pH=6 en baño termostático a 90°C durante 30 minutos para desenmascarar los antígenos. Luego se realizó el bloqueo de sitios de unión inespecíficos con suero de cabra 1% en PBS triton-X100 0,1% durante 10 minutos. Se incubó con el anticuerpo primario correspondiente preparado en la solución de bloqueo durante toda la noche. Al día siguiente se removió el primario, se hicieron 3 lavados con PBS por 5 minutos y se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario. Los secundarios se prepararon como diluciones 1:1000 en la solución de bloqueo. Se utilizaron anticuerpos anti-mouse 555, anti rabbit Alexa 488, anti-mouse 488 y anti rabbit Alexa 555, hechos en cabra o burro (Invitrogen, EEUU). Luego de 1 h se removieron los secundarios y se hicieron lavados con PBS. Se incubaron los cortes durante un minuto en una solución de DAPI 1:5000 para marcar núcleos. Se removió y descartó adecuadamente el DAPI, se realizaron dos lavados con PBS y se montaron los cortes en portaobjetos y cubreobjetos con PVA- DABCO (Sigma, EEUU). Luego del montaje final, se almacenaron los preparados a 4°C hasta su observación en el microscopio de fluorescencia/confocal Olympus TRF SDU del IBYME.

Cuantificación de inmunofluorescencias en tejido

Se adquirieron imágenes confocales de secciones coronales del hipocampo (*stratum radiatum* e hilio), inmunomarcadas con anticuerpos contra GFAP, IR y S100B, utilizando un objetivo de 60X. Para cada corte, se obtuvieron entre dos y tres imágenes de múltiples planos por sección,

promediadas para generar Z-stacks. Realizamos el procesamiento de las imágenes con el software FIJI, empleando el *plug-in* Olympus Viewer. Las células de interés fueron seleccionadas manualmente, definiendo una región cuadrada por célula, y eliminando el fondo mediante la función “*Rolling Ball*”.

Para la cuantificación de GFAP, se aplicó un umbral sobre la región de interés (ROI) de cada célula, determinando el área inmunorreactiva. En paralelo, se evaluó la colocalización con IR, cuantificando el número de *puncta* IR+ dentro del área GFAP+ a partir de los canales fusionados. Por animal se analizaron al menos cuatro secciones seriadas y un mínimo de 20 astrocitos GFAP+ (n=3 animales por grupo). Los resultados se expresaron como promedio del área inmunorreactiva por célula (GFAP) y número de *puncta* IR+ por célula.

En el caso del marcador S100B, se seleccionaron aleatoriamente entre 5 y 6 astrocitos GFAP+ por hilio, utilizando DAPI como referencia nuclear. Se establecieron umbrales para GFAP y S100B, calculando el porcentaje de área GFAP+ ocupada por señal de S100B en cada célula. Se analizaron seis secciones por animal, con un promedio de 30 células evaluadas por ratón.

Materiales y métodos *in vitro*

Cultivos celulares

Cultivo de la línea celular C6

Trabajamos con la línea celular C6 de astrocitoma de rata (RRID:CVCL_0194), derivada de un glioma inducido en ratas Wistar mediante la administración de metilnitrosourea (Benda et al., 1968; Schmidek et al., 1971). Esta línea ha sido ampliamente utilizada en estudios biomédicos relacionados con la biología glial (Barth y Kaur, 2009).

Cultivamos las células en medio RPMI (Gibco o Sigma, EE.UU.), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, Internegocios), manteniéndolas en esterilidad en estufa a 37 °C con una atmósfera controlada al 5% de CO₂.

Obtención de cultivos primarios de astrocitos

Los cultivos celulares primarios fueron obtenidos a partir de ratones C57BL/6 de 1 a 2 días postnatales. Luego de la decapitación y extracción de los cerebros, retiramos las meninges, el tronco del encéfalo y el cerebelo bajo una lupa estereoscópica, en condiciones de flujo laminar horizontal. Los hemisferios cerebrales fueron sumergidos en medio de cultivo DMEM-F12 (Sigma), disgregados con bisturí y transferidos a tubos de fondo cónico tipo Falcon de 15 mL. Posteriormente, completamos la homogenización con una pipeta serológica.

Tras mantener las muestras en hielo por unos minutos, recolectamos el sobrenadante y descartamos el sedimento. A partir de ese momento, continuamos el procedimiento en flujo laminar vertical dentro de la sala de cultivo. Centrifugamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet en 1 mL de medio de cultivo. Cada pellet contenía células correspondientes a dos hemisferios cerebrales, las cuales sembramos en botellas T75 previamente tratadas con polilisina (Sigma).

Los cultivos fueron mantenidos en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Fig. 75). Al cabo de 7 a 10 días de incubación, los astrocitos alcanzaron la confluencia. Seguidamente, eliminamos la microglía, que crece en suspensión, mediante una agitación vigorosa en un agitador orbital a 37°C. Luego de 48 h de agitación, incubamos los cultivos con 5-fluorouracilo durante 24 h con el objetivo de inhibir la proliferación de microglía residual. Posteriormente, mantuvimos los astrocitos durante otras 24 h en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB.

Finalmente, los levantamos utilizando tripsina al 0,125% para proceder al plaqueo según los requerimientos de cada experimento.



Figura 75. Imagen microscópica representativa de un cultivo primario de astrocitos murinos.

Preparación de β -amiloide₁₋₄₂ fibrilar

Utilizamos péptido β -amiloide₁₋₄₂ (A β ; Cayman Chem, EEUU) en su conformación fibrilar como modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer. Para inducir la formación de fibrillas, diluimos parcialmente el péptido en agua destilada e incubamos la solución en condiciones estériles a 37 °C durante 72 horas (Gregosa et al., 2019). Una vez obtenida la forma fibrilar, preparamos las diluciones correspondientes (0,5 μ M o 0,05 μ M) en medio DMEM-F12, según los requerimientos de cada tratamiento.

Preparación de palmitato

Preparamos una solución stock de ácido palmítico disolviendo el compuesto (Sigma-Aldrich) en etanol al 50% hasta alcanzar una concentración de 150 mM, calentando la mezcla a 60 °C para

facilitar su solubilización. Posteriormente, acomplejamos el palmitato en una solución de BSA (albúmina sérica bovina) libre de ácidos grasos al 10% (Sigma-Aldrich), en una relación molar 5:1 de palmitato:BSA. Esta mezcla fue incubada durante 1 h a 37 °C con agitación constante, obteniendo un stock final de palmitato 7,5 mM en BSA al 10%.

Para el tratamiento de las C6, diluimos este stock en RPMI con 2% SFB a una concentración de trabajo de 0,5 mM de palmitato, justo antes de la incubación con las células.

Tratamiento con insulina *in vitro*

Preparamos un stock de insulina diluido en solución fisiológica estéril y ajustamos las concentraciones requeridas directamente en el medio de cultivo (DMEM-F12 o RPMI sin glucosa), según el diseño experimental. Para los ensayos de señalización, tratamos las células con insulina 1 μ M en DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB durante 2 h. En los experimentos de captación de glucosa y liberación de lactato, añadimos insulina a los pocillos para alcanzar una concentración final de 1 μ M durante la última hora de incubación. En el caso del ensayo de funcionalidad mitocondrial con MitoTracker Red (Invitrogen), co-incubamos insulina (1 μ M) junto con A β ₁₋₄₂ (0,5 μ M) durante 24 h.

Extracción de proteínas y Western Blot en cultivos celulares de astrocitos – Línea C6

Para los ensayos de Western blot, sembramos células de la línea C6 de astrocitoma de rata en placas de 6 pocillos, considerando cada pocillo como una réplica experimental. Sembramos aproximadamente 250.000 células por pocillo y las dejamos crecer durante 48 h hasta alcanzar la confluencia, momento en el que iniciamos los tratamientos.

En todos los casos, al finalizar la incubación con los tratamientos, retiramos el medio y estimulamos las células con insulina a 1 μ M en medio RPMI con 2% de SFB durante 15 minutos.

Tras la estimulación, lavamos rápidamente las células con PBS frío y procedimos a la recolección celular utilizando buffer de lisis y un scraper. Determinamos la concentración proteica mediante el

método colorimétrico de Bradford y ajustamos todas las muestras a una concentración uniforme. Conservamos las muestras a -20°C hasta su procesamiento.

Para el análisis por Western blot, cargamos $30\text{ }\mu\text{g}$ de proteína por calle y seguimos el mismo protocolo aplicado para las muestras de tejido. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-pAKT (fosforilación en S473; Cell Signaling; dilución 1:500), anti-AKT (Cell Signaling; 1:500), anti-receptor de insulina IR (Abcam; 1:500), y anti-actina (Santa Cruz; 1:200).

Para evaluar los niveles de las proteínas de interés, se procedió de la misma manera que lo descrito previamente en el WB de muestras de tejido.

Extracción de proteínas y Western Blot en cultivos celulares de astrocitos – astrocitos primarios

Para los ensayos de Western blot, sembramos astrocitos de cultivo primario en placas de 6 pocillos, considerando cada pocillo como una réplica experimental. Sembramos aproximadamente 250.000 células por pocillo y las dejamos crecer entre 5 y 7 días hasta alcanzar la confluencia, momento en el que iniciamos los tratamientos.

Incubamos las células con $\text{A}\beta_{1-42}$ a una concentración final de $0,5\text{ }\mu\text{M}$ en medio completo DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB, durante 2 o 24 h, según el experimento. En una de las condiciones experimentales, estimulamos las células con insulina a $1\text{ }\mu\text{M}$ durante 2 h luego de retirar el estímulo con $\text{A}\beta$; en otro protocolo, añadimos insulina durante las últimas 2 h de la incubación con $\text{A}\beta$.

Al finalizar los tratamientos, lavamos las células rápidamente con PBS frío y las recolectamos utilizando buffer de lisis y un scraper. Determinamos la concentración proteica mediante el método de Bradford y ajustamos todas las muestras a una concentración uniforme. Almacenamos las muestras a -20°C hasta su procesamiento.

Para el análisis por Western blot, cargamos $30\text{ }\mu\text{g}$ de proteína por carril y empleamos el mismo procedimiento utilizado para las muestras de tejido. Utilizamos los siguientes anticuerpos: para proteínas fosforiladas, anti-pIR (fosforilación en Y1361; Abcam, 1:500 en TTBS) y anti-pAKT (fosforilación en S473; Cell Signaling, 1:500); y para proteínas totales, anti-IR (Abcam, 1:500), anti-AKT (Cell Signaling, 1:500) y anti-actina (Santa Cruz, 1:200).

Inmunofluorescencia en astrocitos de cultivo primario

Para los ensayos de inmunofluorescencia, sembramos 35.000 astrocitos primarios por pocillo en placas de 24 pocillos, colocando previamente un cubreobjetos esterilizado recubierto con polilisina en el fondo de cada uno. Una vez que las células alcanzaron la confluencia (aproximadamente a los 3 días), iniciamos los tratamientos experimentales. El grupo control fue incubado en medio DMEM-F12 complementado con 10% de SFB. Los grupos tratados fueron expuestos a $A\beta_{1-42}$ fibrilizado (0,5 μ M) durante 2 o 24 h, con o sin co-incubación con insulina (1 μ M) durante el tiempo correspondiente. Finalizados los tratamientos, lavamos las células con PBS frío durante 5 minutos. En los casos en los que la inmunofluorescencia fuera a realizarse para detectar una proteína intracelular, la fijación se realizó con metanol frío (5 minutos). Luego de retirar el fijador, realizamos tres lavados consecutivos con PBS (5 minutos cada uno). Para el desenmascaramiento antigénico, incubamos las muestras en buffer citrato 10 mM (pH 6) a 85 °C durante 10 minutos en un baño termostático. Posteriormente, permeabilizamos las células con PBS-Triton X-100 al 0,25% durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Seguidamente, el bloqueo se realizó con una solución de BSA al 1% en PBS-Tween 0,05% durante 30 minutos. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en esta misma solución de bloqueo y las muestras se incubaron a 4 °C por 18-24 h. Finalmente, lavamos con PBS y añadimos los anticuerpos secundarios, protegidos de la luz, durante 1 h a temperatura ambiente.

Por otro lado, para revelar proteínas de membrana y preservar las estructuras celulares, luego de los tratamientos y lavados, realizamos la fijación de las células con PFA 4% durante 15 minutos. Luego, seguimos los mismos pasos de que los mencionados anteriormente, exceptuando el paso de citrato y de permeabilización de membranas.

Luego de tres lavados adicionales con PBS, realizamos la tinción nuclear con DAPI (1:5000) y montamos los cubreobjetos sobre portaobjetos con medio PVA-DABCO. Conservamos las preparaciones a 4 °C hasta su análisis por microscopía de fluorescencia o confocal.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-NF κ B (Santa Cruz), anti-IR (Abcam), anti-4G8 (Santa Cruz), anti-EAAT2/GLT-1 (Abcam, ab41621), anti-S100B (Sigma) y anti-GLUT1 (Abcam, ab652).

Cuantificación de la translocación nuclear de NFκB

La translocación nuclear de NFκB se evaluó mediante un score cualitativo realizado en al menos 30 células por pocillo de cultivo. Se asignó un valor de 0 a las células con fluorescencia claramente mayor en el citoplasma que en el núcleo, un valor de 1 a las células con tinción citoplasmática y nuclear similar, y un valor de 2 a las células con fluorescencia claramente mayor en el núcleo que en el citoplasma. La puntuación resultante se promedió para todas las células de cada muestra.

Cuantificación de la densidad óptica de IR

La señal de IR fue cuantificada en astrocitos primarios de ratón teñidos mediante inmunofluorescencia y analizados por microscopía confocal. Para cada célula, se realizaron dos tipos de mediciones utilizando el software FIJI (ImageJ): una sobre el área total celular y otra restringida al borde de la célula.

Para la cuantificación de la densidad óptica (DO) total, delimitamos manualmente el contorno completo de cada célula con ayuda del canal de campo claro, asegurando una correcta identificación de los límites celulares. A partir de esta selección, se midió la intensidad media de fluorescencia correspondiente a la marca de IR (canal verde), expresada como DO.

Para evaluar la acumulación de IR en los bordes celulares, utilizamos la herramienta de línea de forma libre (*freehand line*) para trazar el perímetro de cada célula y medir la intensidad media de la señal exclusivamente sobre esa región periférica.

Ambas mediciones se realizaron sobre un número igual de células por condición experimental.

Cuantificación de la distribución celular de GLUT1

La distribución subcelular del transportador de glucosa GLUT1 fue evaluada en astrocitos primarios mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Para analizar la redistribución del transportador hacia la membrana plasmática, se midió la densidad óptica (DO) de la señal de GLUT1 (canal rojo) en dos regiones celulares: el soma y el borde.

Las mediciones se realizaron utilizando el software FIJI. Primero, para cada célula, se delimitó el área del soma a partir del canal DAPI, evitando incluir procesos celulares o bordes, y se cuantificó la DO media del marcador en esa región. Luego, se utilizó la herramienta de línea de forma libre para trazar el perímetro celular, donde se midió la DO del GLUT1 específicamente en los bordes.

El resultado fue expresado como un cociente entre la señal en el borde y la señal en el soma, reflejando así el grado de redistribución del transportador hacia la membrana celular. Esta relación fue calculada para 18 a 24 células por grupo experimental.

Tinción con sondas fluorescentes

Para los ensayos de tinción con sondas, utilizamos el mismo protocolo de siembra aplicado en inmunofluorescencia, sembrando 35.000 astrocitos primarios por pocillo en placas de 24 pocillos, sobre cubreobjetos esterilizados y recubiertos con polilisina. Luego de alcanzar la confluencia (3 días), las células fueron sometidas a los tratamientos experimentales correspondientes.

MitoSOX™ Red

Utilizamos MitoSOX™ Red (Molecular Probes, Invitrogen, M36008), un derivado catiónico de dihidroetidio (DHE), para detectar la generación de anión superóxido de origen mitocondrial. En presencia de este radical, se forma 2-hidroximoetidio, con excitación a 510 nm y emisión a 580 nm. Incubamos las células con MitoSOX 5 μ M en PBS durante 15 minutos a 37 °C. A continuación, fijamos con PFA al 4% durante 15 minutos, lavamos con PBS, contrateñimos con DAPI (1:5000) y montamos los cubreobjetos con medio PVA-DABCO. En el caso de todas las sondas descritas a continuación, las preparaciones fueron conservadas a 4 °C hasta su análisis por microscopía de fluorescencia o confocal, 24 h después de la fijación.

Cuantificación de la densidad óptica de MitoSOX

Posteriormente realizamos la cuantificación de la densidad óptica media de MitoSOX por célula con un n de 40 células por condición experimental.

Las imágenes fueron adquiridas luego de 24 horas de finalizado el montaje por microscopía confocal manteniendo constantes los parámetros de adquisición entre condiciones para asegurar la comparabilidad.

Para la cuantificación de la señal, utilizamos el software FIJI (ImageJ). En cada imagen, delimitamos manualmente el contorno de cada célula individual utilizando la herramienta de selección libre, basándonos en la morfología celular visible en la señal de campo claro. Dentro de cada ROI, medimos la DO media, definida como la intensidad promedio de fluorescencia del canal rojo

correspondiente a MitoSOX. Este análisis se realizó sobre un total de 40 células por condición experimental.

MitoTracker™ Red

Empleamos MitoTracker™ Red (Thermo Fisher, Invitrogen) para evaluar la funcionalidad mitocondrial en función del potencial de membrana, ya que esta sonda se acumula selectivamente en mitocondrias activas. Preparamos la solución a una concentración final de 500 nM en medio DMEM-F12 sin suero. Incubamos las células durante 30 minutos a 37 °C, luego fijamos con metanol frío durante 5 minutos, realizamos lavados con PBS, marcamos núcleos con DAPI y montamos las preparaciones con PVA-DABCO.

Cuantificación de la densidad óptica, tamaño y densidad mitocondrial

Para analizar los cambios en la señal mitocondrial en astrocitos, cuantificamos imágenes obtenidas por microscopía confocal de células teñidas con MitoTracker Red y contrateñidas con DAPI.

La cuantificación se realizó con el software FIJI (ImageJ). Para cada imagen, seleccionamos una célula individual utilizando una ROI rectangular, y duplicamos el canal correspondiente a MitoTracker. A continuación, corregimos el fondo mediante la herramienta de sustracción de fondo *Subtract Background* con un radio de *rolling ball* de 50 píxeles.

La DO media de la señal mitocondrial se determinó midiendo la intensidad promedio de la señal de MitoTracker dentro del ROI celular.

Para calcular la densidad mitocondrial, aplicamos un umbral de intensidad sobre la imagen corregida para segmentar las estructuras mitocondriales, generamos una máscara binaria y utilizamos la herramienta *Analyze Particles* para cuantificar el número total de mitocondrias por célula, el cual relativizamos al área de cada célula.

El tamaño promedio mitocondrial se obtuvo a partir del mismo análisis de partículas, utilizando el área media de cada objeto segmentado dentro de la célula. Todas las mediciones se realizaron sobre un total de 35 células individuales por condición experimental.

BODIPY™ 493/503

Utilizamos BODIPY™ 493/503 (Thermo Fisher, Invitrogen) para la detección de lípidos neutros, como triglicéridos y ésteres de colesterol, presentes en gotas lipídicas citoplasmáticas. La sonda fue

diluida a 10 μ M en DMEM-F12 sin suero. Incubamos las células durante 30 minutos a 37 °C, y luego seguimos el mismo procedimiento de fijación, lavado, marcación nuclear y montaje utilizado para MitoTracker.

Cuantificación de la densidad y tamaño de gotas lipídicas

Para evaluar la presencia y características morfológicas de las gotas lipídicas, se utilizaron imágenes confocales adquiridas tras la tinción simultánea de los astrocitos con MitoTracker Red y BODIPY 493/503 (verde). Todas las células fueron además contrateñidas con DAPI. Las imágenes fueron procesadas y analizadas con el software FIJI (ImageJ).

La cuantificación se realizó sobre las mismas imágenes utilizadas para el análisis mitocondrial. El canal correspondiente a BODIPY fue duplicado y procesado mediante la herramienta de umbralización (*Threshold*) para generar una máscara binaria de las gotas lipídicas. Posteriormente, se aplicó la función *Watershed* para separar partículas contiguas, y se realizó un conteo y medición del tamaño promedio de las gotas utilizando la función *Analyze Particles*. Este procedimiento permitió calcular tanto la densidad (número de gotas por célula) como el tamaño promedio de las gotas lipídicas en cada condición experimental. Este análisis se aplicó a un total de 15–16 células por condición.

MitoSpy™ Green

Empleamos MitoSpy™ Green (BioLegend) para el análisis morfológico mitocondrial, ya que esta sonda fluorescente no depende del potencial de membrana. La tinción se realizó según las instrucciones del fabricante, incubando las células con la sonda diluida en medio sin suero durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, las muestras fueron fijadas, lavadas y montadas siguiendo el mismo protocolo aplicado para las demás sondas.

Cuantificación de la densidad y tamaño mitocondrial

La señal mitocondrial fue analizada en astrocitos primarios teñidos con la sonda MitoSpy Green, utilizando imágenes obtenidas por microscopía confocal. Para la cuantificación, trabajamos con imágenes contrateñidas con DAPI y analizamos un total de 15 células por condición experimental. El análisis se realizó con el software FIJI (ImageJ), mediante una serie de macros diseñadas para estandarizar el procesamiento de las imágenes. En primer lugar, se seleccionó un área cuadrada

correspondiente a una única célula, se duplicaron los canales relevantes y sustracción de fondo (mediante la herramienta *rolling ball*).

Luego, se seleccionó manualmente el contorno de la célula, delimitando así el área total para la medición. A continuación, se aplicó un umbral automático (algoritmo OTSU) con un rango de intensidad determinado.

Finalmente, para evaluar el tamaño promedio de las mitocondrias, se realizó un proceso de segmentación de las estructuras mitocondriales (tubularización), y cuantificación de las partículas individuales utilizando un rango de tamaño definido.

Los parámetros usados para las sondas se resumen en la siguiente tabla:

Sonda	Finalidad	Concentración	Medio de incubación	Tiempo de incubación	Fijación
MitoSOX™ Red	Detección de superóxido mitocondrial	5 µM	PBS	15 min a 37 °C	PFA 4% (15 min)
MitoTracker™ Red	Evaluación del potencial de membrana mitocondrial	500 nM	DMEM-F12 sin suero	30 min a 37 °C	Metanol frío (5 min)
BODIPY™ 493/503	Tinción de lípidos neutros / gotas lipídicas	10 µM	DMEM-F12 sin suero	30 min a 37 °C	Metanol frío (5 min)
MitoSpy™ Green	Visualización de morfología mitocondrial	250 nM	Medio sin suero (recomendado)	30 min a 37 °C	PFA 4% (15 min)

Tabla 3. Parámetros de tinción con sondas fluorescentes en astrocitos primarios.

Medición de captación de glucosa con 2-NBDG

Evaluamos la captación de glucosa en astrocitos utilizando la sonda fluorescente 2-NBDG (Invitrogen y Cayman Chem), un análogo no metabolizable de glucosa, en cultivos de la línea C6 y en astrocitos primarios. Realizamos mediciones por fluorimetría, imágenes automatizadas y citometría de flujo, según el experimento.

Fluorimetría en línea C6

Sembramos 15.000 células C6 por pocillo en placas de 96 pocillos con medio RPMI suplementado con 10% de SFB. Al alcanzar la confluencia, trabajamos con cinco condiciones experimentales (n = 3 por grupo). Tratamos las células con A β ₁₋₄₂ fibrilizado (0,5 μ M) durante 24 h. En los controles, se renovó el medio sin añadir A β . Preparamos insulina (1 μ M) y 2-NBDG (100 μ M) en RPMI 2% SFB.

Luego, incubamos las células con la mezcla que incluía insulina, A β (según grupo) y 2-NBDG durante 1 h a 37 °C, en oscuridad. Al finalizar, retiramos el medio, lavamos con PBS y añadimos 100 μ L de DMSO por pocillo. Lisamos las células mediante pipeteo y transferimos el contenido a una placa negra para lectura de fluorescencia en un lector multimodal (Spark, Tecan).

Fluorimetría en cultivo primario

Sembramos 15.000 astrocitos primarios por pocillo en placas de 96 y los dejamos alcanzar confluencia (aproximadamente 3 días). Luego, tratamos con A β (0,5 μ M) en medio DMEM-F12 10% SFB durante 24 h. Posteriormente, reemplazamos el medio por RPMI sin glucosa conteniendo insulina (1 μ M) y 2-NBDG (100 μ M), con o sin A β según grupo, e incubamos 1 h a 37 °C en oscuridad. Finalizado el tratamiento, seguimos el mismo protocolo de lisis y medición que para la línea C6.

Análisis por imágenes con Incucyte

Sembramos 35.000 astrocitos primarios por pocillo en placas de 24 pocillos con cubreobjetos tratados con polilisina. A los 3 días de cultivo, tratamos las células con A β fibrilizado (0,5 μ M) durante 24 h. Para evaluar la participación de los receptores de insulina y de IGF1, co-incubamos grupos experimentales con BMS-536924 (1 μ M; inhibidor de IR/IGF1R; Cayman Chem) o NVP-ADW742 (5 μ M; inhibidor de IGF1R; Cayman Chem) durante el mismo período. Finalizado el

tratamiento, reemplazamos el medio por RPMI sin glucosa con insulina (1 μ M) y 2-NBDG (100 μ M), incubando las muestras durante 1 h a 37 °C en oscuridad. Luego se agregó buffer Earle y las placas fueron colocadas en el sistema Incucyte Live-Cell Analysis System (Sartorius), que capturó imágenes de fluorescencia en tiempo real para su análisis posterior.

Citometría de flujo en astrocitos primarios

Sembramos 25.000 astrocitos primarios en placas de 48 pocillos. Tras alcanzar la confluencia (aproximadamente 3 días), incubamos las células con 2-NBDG (100 μ M) durante 10 minutos a 37 °C en condiciones experimentales específicas. Al finalizar, realizamos dos lavados rápidos con PBS frío, y luego despejamos las células con tripsina al 0,125% durante 5 minutos. Inhibimos la tripsina con 200 μ L de medio RPMI 2% SFB y resuspendimos las células con ciclos de pipeteo. Transferimos las suspensiones a tubos Eppendorf, centrifugamos a 800 rpm en microcentrífuga durante 5 minutos, descartamos el sobrenadante y resuspendimos los pellets en 200 μ L de buffer FACS (PBS con 2% SFB). Mantuvimos las muestras en hielo hasta su análisis inmediato por citometría (BD).

Utilizamos el canal FITC-A para la detección de fluorescencia. Los datos fueron representados en diagramas de dispersión (scatter plots), donde el eje FSC-A reflejó el tamaño celular y el eje SSC-A la complejidad o granularidad celular.

Liberación de lactato en cultivo primario

Sembramos 15.000 células por pocillo en placas de 96 y las incubamos hasta alcanzar la confluencia, lo cual ocurrió aproximadamente a los 3 días. Posteriormente, aplicamos los respectivos tratamientos y establecimos dos protocolos de recolección del medio para medir la liberación de lactato por los astrocitos. En el primer protocolo, tras lavar los tratamientos, reemplazamos el medio por DMEM-F12 sin suero y dejamos incubar las muestras durante 2 horas; en el segundo, luego de lavar los tratamientos, utilizamos buffer Earle durante 1 hora. En ambos casos, colectamos los medios condicionados.

Para determinar la liberación de lactato por los astrocitos primarios, empleamos un kit colorimétrico (Roche). Este kit para la determinación de lactato es un ensayo colorimétrico que se fundamenta en la oxidación enzimática del lactato. En este método, la lactato oxidasa cataliza la

conversión del lactato en piruvato, generando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como subproducto. En la primera etapa, se añade el reactivo 1, que contiene la enzima y otros componentes necesarios para iniciar la reacción; tras la incubación inicial y la medición de la absorbancia a 492 nm, se añade el reactivo 2. Este reactivo contiene los elementos que, en presencia del H_2O_2 , facilitan la reacción peroxidasa con un sustrato cromógeno, generando un compuesto coloreado cuya intensidad es proporcional a la cantidad de lactato presente en la muestra. La absorbancia final, registrada a 492 nm, se correlaciona con la concentración de lactato, permitiéndonos cuantificar su liberación en el cultivo primario.

En una placa de 96 pocillos, agregamos 90 μL de reactivo 1 en cada pocillo y añadimos 10 μL de la muestra a medir. Posteriormente, incubamos la placa durante 5 minutos a 37 °C y registramos la absorbancia a 492 nm. A continuación, agregamos 18 μL de reactivo 2, incubamos durante 15 minutos a 37 °C, observamos el desarrollo del color y registramos nuevamente la absorbancia a 492 nm.

Detección de glucógeno (tinción de PAS)

Una vez finalizados los tratamientos, fijamos las células con metanol frío durante 5 minutos. Posteriormente, realizamos dos lavados con etanol 70% e incubamos las muestras durante 30 minutos con ácido peryódico (Sigma), lo que oxida los grupos alcohol secundarios en los anillos de glucosa y genera grupos aldehídos libres. A continuación, efectuamos tres lavados adicionales con etanol 70% y, luego, incubamos durante 1 h con reactivo de Schiff (Biopack, Argentina). Este reactivo, compuesto por fucsina básica decolorada con dióxido de azufre, reacciona con los grupos aldehídos, restaurando la coloración púrpura o rosa característica del complejo de Schiff. Finalmente, lavamos con PBS para eliminar el exceso de Schiff, marcamos con DAPI y montamos los cubreobjetos con medio de montaje PVA-DABCO.

Cuantificación de glucógeno mediante tinción de PAS

El contenido de glucógeno en astrocitos primarios se evaluó mediante el análisis de imágenes confocales. Para la cuantificación, se utilizó el software FIJI. En primer lugar, se delimitó manualmente el área de cada célula individual en las imágenes, utilizando el canal de campo claro

como referencia morfológica. Luego, se sustrajo el background en el canal rojo (PAS) con la herramienta *rolling ball* (radio = 50), se aplicó un umbral uniforme a todas las imágenes para detectar las estructuras PAS positivas y se generó una máscara binaria.

Posteriormente, se cuantificaron las partículas PAS+ (puncta) en cada célula mediante la función *Analyze Particles*. Los resultados fueron normalizados al área total de la célula analizada, expresándose como número de puncta PAS+ por μm^2 . Esta cuantificación se realizó sobre un número total de 24 a 30 células por grupo experimental.

Ensayo de incorporación de A β

Para este experimento, sembramos astrocitos primarios sobre cubreobjetos previamente recubiertos con polilisina y colocados en placas de 24 pocillos. Una vez que las células alcanzaron aproximadamente un 50% de confluencia, las expusimos durante 1 hora a tres condiciones experimentales, todas ellas con A β a una concentración final de 0,05 μM .

Previo a su aplicación, sonicamos el A β utilizando un equipo Bioruptor Plus (Diagenode), aplicando 5 ciclos de 15 segundos “ON” seguidos de 30 segundos “OFF”. Este procedimiento nos permitió evitar la formación de agregados de alto peso molecular, asegurando así una preparación homogénea del péptido (en su forma soluble o fibrilar) que pudiera ser internalizada por los astrocitos.

La primera condición experimental contenía únicamente A β , mientras que las otras dos incluían además insulina en concentraciones crecientes (0,1 μM y 1 μM). Luego del período de incubación, fijamos las células con PFA al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente y continuamos con el protocolo de inmunocitoquímica detallado en la sección correspondiente.

Para la cuantificación, utilizamos el software FIJI (ImageJ), midiendo el porcentaje del área total de cada célula ocupada por la señal positiva correspondiente a la inmunomarca de 4G8.

Estadística

Determinamos el tamaño de la muestra utilizando el software StatMate 2.0 (GraphPad Software Inc.), basándonos en datos de estudios previos (Beauquis et al., 2014; Gregosa et al., 2019). Para las pruebas conductuales, basamos nuestro cálculo en Beauquis et al. 2014. El resultado determinó

un tamaño de muestra de al menos 7 ratones por grupo para detectar una diferencia del 15% con una potencia del 80% asumiendo una desviación estándar del 10%. Para los análisis bioquímicos e histológicos, basamos el cálculo en Beauquis et al. (2014) y Gregosa et al. (2019), obteniendo que se requerían al menos 4 ratones por grupo para detectar una diferencia del 20% con un poder del 80% asumiendo una desviación estándar del 10%. Este enfoque garantizó que el estudio tuviera suficiente poder para identificar efectos significativos, minimizando al mismo tiempo el número de animales utilizados. Aunque el tamaño de muestra fue menor que el calculado en algunos análisis debido a limitaciones técnicas, pudimos detectar diferencias entre los grupos.

Realizamos la adquisición y el análisis de los datos experimentales bajo condiciones ciegas respecto a la información de los grupos. Los análisis estadísticos incluyeron la prueba t de Student para muestras independientes, ANOVA de una vía o de dos vías con pruebas *post hoc* de Sidak, Tukey o Dunnett, según se detalla en cada experimento en la sección de Resultados, y se llevaron a cabo con el software Prism 9.0 (GraphPad Software Inc.). Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar de la media.

Para los experimentos in vivo, n corresponde a un ratón. Para los experimentos in vitro, n corresponde a experimentos independientes, células o campos, según se detalla en cada resultado.

Bibliografía

- 2023 Alzheimer's disease facts and figures. (2023). *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 19(4), 1598–1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Abdul, H. M., Sama, M. A., Furman, J. L., Mathis, D. M., Beckett, T. L., Weidner, A. M., Patel, E. S., Baig, I., Murphy, M. P., LeVine, H., Kraner, S. D., & Norris, C. M. (2009). Cognitive decline in Alzheimer's disease is associated with selective changes in calcineurin/NFAT signaling. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(41), 12957–12969. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1064-09.2009>
- Aduhelm Lawsuit. (n.d.). *Levin Law*. Retrieved June 22, 2025, from <https://levinlaw.com/aduhelm-lawsuit/>
- Akintola, A. A., & van Heemst, D. (2015). Insulin, aging, and the brain: Mechanisms and implications. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00013>
- Akiyama, H., Arai, T., Kondo, H., Tanno, E., Haga, C., & Ikeda, K. (2000). Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 14 Suppl 1, S47-53. <https://doi.org/10.1097/00002093-200000001-00008>
- Allaman, I., Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: For better and for worse. *Trends in Neurosciences*, 34(2), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.12.001>
- Allaman, I., Gavillet, M., Bélanger, M., Laroche, T., Viertl, D., Lashuel, H. A., & Magistretti, P. J. (2010). Amyloid- β Aggregates Cause Alterations of Astrocytic Metabolic Phenotype: Impact on Neuronal Viability. *The Journal of Neuroscience*, 30(9), 3326–3338. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5098-09.2010>
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, 457(7230), 675–677. <https://doi.org/10.1038/457675a>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22(5), 208–215. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01349-6)
- Arnold, S. E., Arvanitakis, Z., Macauley-Rambach, S. L., Koenig, A. M., Wang, H.-Y., Ahima, R. S., Craft, S., Gandy, S., Buettner, C., Stoeckel, L. E., Holtzman, D. M., & Nathan, D. M. (2018). Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: Concepts and conundrums. *Nature Reviews. Neurology*, 14(3), 168–181. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.185>

- Baker, L. D., Cross, D. J., Minoshima, S., Belongia, D., Watson, G. S., & Craft, S. (2011). Insulin Resistance and Alzheimer-like Reductions in Regional Cerebral Glucose Metabolism for Cognitively Normal Adults With Prediabetes or Early Type 2 Diabetes. *Archives of Neurology*, 68(1), 51–57. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.225>
- Banks, W. A., Jaspan, J. B., & Kastin, A. J. (1997). Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: Novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides*, 18(8), 1257–1262. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(97\)00198-8](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(97)00198-8)
- Banks, W. A., Owen, J. B., & Erickson, M. A. (2012). Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacology & Therapeutics*, 136(1), 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.006>
- Barros, L. F. (2022). How expensive is the astrocyte? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 42(5), 738–745. <https://doi.org/10.1177/0271678X221077343>
- Bazinet, R. P., & Layé, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 15(12), 771–785. <https://doi.org/10.1038/nrn3820>
- Beard, E., Lengacher, S., Dias, S., Magistretti, P. J., & Finsterwald, C. (2022). Astrocytes as Key Regulators of Brain Energy Metabolism: New Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Physiology*, 12, 825816. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.825816>
- Beauquis, J., Vinuesa, A., Pomilio, C., Pavía, P., Galván, V., & Saravia, F. (2014). Neuronal and glial alterations, increased anxiety, and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer’s disease. *Hippocampus*, 24(3), Article 3. <https://doi.org/10.1002/hipo.22219>
- Bero, A. W., Yan, P., Roh, J. H., Cirrito, J. R., Stewart, F. R., Raichle, M. E., Lee, J.-M., & Holtzman, D. M. (2011). Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid- β deposition. *Nature Neuroscience*, 14(6), 750–756. <https://doi.org/10.1038/nn.2801>
- Bertram, L., Lill, C. M., & Tanzi, R. E. (2010). The genetics of Alzheimer disease: Back to the future. *Neuron*, 68(2), 270–281. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.013>
- Bethe, A. (1899). Ueber die Neurofibrillen in den Ganglienzellen von Wirbelthieren und ihre Beziehungen zu den Golginetzen. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 55(1), 513–558. <https://doi.org/10.1007/BF02977746>

- Biessels, G. J., & Reagan, L. P. (2015). Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(11), 660–671. <https://doi.org/10.1038/nrn4019>
- Biessels, G. J., & Reijmer, Y. D. (2014). Brain changes underlying cognitive dysfunction in diabetes: What can we learn from MRI? *Diabetes*, 63(7), 2244–2252. <https://doi.org/10.2337/db14-0348>
- Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V., & Ruiz-Albusac, J. M. (2014). Insulin in the brain: Its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 161. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00161>
- Blennow, K., Leon, M. J. de, & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 368(9533), 387–403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)
- Boles, A., Kandimalla, R., & Reddy, P. H. (2017). Dynamics of diabetes and obesity: Epidemiological perspective. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1863(5), 1026–1036. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.016>
- Brain Energy Metabolism*. (n.d.). Retrieved June 22, 2025, from https://acnp.org/g4/GN401000064/CH064.HTML?utm_source=chatgpt.com
- Cabezas-Opazo, F. A., Vergara-Pulgar, K., Pérez, M. J., Jara, C., Osorio-Fuentealba, C., & Quintanilla, R. A. (2015). Mitochondrial Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 509654. <https://doi.org/10.1155/2015/509654>
- Camandola, S., & Mattson, M. P. (2017). Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 36(11), 1474–1492. <https://doi.org/10.15252/embj.201695810>
- Carro, E., & Torres-Aleman, I. (2004). Insulin-like growth factor I and Alzheimer's disease: Therapeutic prospects? *Expert Review of Neurotherapeutics*, 4(1), 79–86. <https://doi.org/10.1586/14737175.4.1.79>
- Carter, S. F., Chiotis, K., Nordberg, A., & Rodriguez-Vieitez, E. (2019). Longitudinal association between astrocyte function and glucose metabolism in autosomal dominant Alzheimer's disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 46(2), 348–356. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4217-7>
- Castano, E. M., Prelli, F., Wisniewski, T., Golabek, A., Kumar, R. A., Soto, C., & Frangione, B. (1995). Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *The Biochemical Journal*, 306 (Pt 2)(Pt 2), 599–604. <https://doi.org/10.1042/bj3060599>

- Cerasuolo, M., Di Meo, I., Auriemma, M. C., Paolisso, G., Papa, M., & Rizzo, M. R. (2024). Exploring the Dynamic Changes of Brain Lipids, Lipid Rafts, and Lipid Droplets in Aging and Alzheimer's Disease. *Biomolecules*, 14(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/biom14111362>
- Chen, W., Huang, Q., Lazdon, E. K., Gomes, A., Wong, M., Stephens, E., Royal, T. G., Frenkel, D., Cai, W., & Kahn, C. R. (2023). Loss of insulin signaling in astrocytes exacerbates Alzheimer-like phenotypes in a 5xFAD mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(21), e2220684120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2220684120>
- Chen, Y., Zhao, S., Fan, Z., Li, Z., Zhu, Y., Shen, T., Li, K., Yan, Y., Tian, J., Liu, Z., & Zhang, B. (2021). Metformin attenuates plaque-associated tau pathology and reduces amyloid- β burden in APP/PS1 mice. *Alzheimer's Research & Therapy*, 13, 40. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00761-9>
- Chiu, S.-L., Chen, C.-M., & Cline, H. T. (2008). Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. *Neuron*, 58(5), 708–719. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.014>
- Christie, J. M., Wenthold, R. J., & Monaghan, D. T. (1999). Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 72(4), 1523–1528. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.721523.x>
- Cirillo, C., Capoccia, E., Iuvone, T., Cuomo, R., Sarnelli, G., Steardo, L., & Esposito, G. (2015). S100B Inhibitor Pentamidine Attenuates Reactive Gliosis and Reduces Neuronal Loss in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2015, 508342. <https://doi.org/10.1155/2015/508342>
- Clarke, D. W., Boyd, F. T., Kappy, M. S., & Raizada, M. K. (1984). Insulin binds to specific receptors and stimulates 2-deoxy-D-glucose uptake in cultured glial cells from rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(19), 11672–11675.
- Corriveau-Lecavalier, N., Adams, J. N., Fischer, L., Molloy, E. N., & Maass, A. (2024). Cerebral hyperactivation across the Alzheimer's disease pathological cascade. *Brain Communications*, 6(6), fcae376. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcae376>
- Craft, S., Baker, L. D., Montine, T. J., Minoshima, S., Watson, G. S., Claxton, A., Arbuckle, M., Callaghan, M., Tsai, E., Plymate, S. R., Green, P. S., Leverenz, J., Cross, D., & Gerton, B. (2012). Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive

- impairment: A pilot clinical trial. *Archives of Neurology*, 69(1), 29–38.
<https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.233>
- Craft, S., Cholerton, B., & Baker, L. D. (2013). Insulin and Alzheimer's Disease: Untangling the Web. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33(s1), S263–S275. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129042>
- Craft, S., Raman, R., Chow, T. W., Rafii, M. S., Sun, C.-K., Rissman, R. A., Donohue, M. C., Brewer, J. B., Jenkins, C., Harless, K., Gessert, D., & Aisen, P. S. (2020). Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*, 77(9), 1099–1109.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1840>
- Cunnane, S. C., Courchesne-Loyer, A., Vandenberghe, C., St-Pierre, V., Fortier, M., Hennebelle, M., Croteau, E., Bock, C., Fulop, T., & Castellano, C.-A. (2016). Can Ketones Help Rescue Brain Fuel Supply in Later Life? Implications for Cognitive Health during Aging and the Treatment of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, 53.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00053>
- Cunningham, C., Wilcockson, D. C., Campion, S., Lunnon, K., & Perry, V. H. (2005). Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(40), 9275–9284.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2614-05.2005>
- de Bresser, J., Tiehuis, A. M., van den Berg, E., Reijmer, Y. D., Jongen, C., Kappelle, L. J., Mali, W. P., Viergever, M. A., Biessels, G. J., & Utrecht Diabetic Encephalopathy Study Group. (2010). Progression of cerebral atrophy and white matter hyperintensities in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 33(6), 1309–1314. <https://doi.org/10.2337/dc09-1923>
- de la Monte, S. M. (2014). Type 3 diabetes is sporadic Alzheimer's disease: Mini-review. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 24(12), 1954–1960.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.06.008>
- de Oliveira, J., Kucharska, E., Garcez, M. L., Rodrigues, M. S., Quevedo, J., Moreno-Gonzalez, I., & Budni, J. (2021). Inflammatory Cascade in Alzheimer's Disease Pathogenesis: A Review of Experimental Findings. *Cells*, 10(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/cells10102581>

- Dhapola, R., Kumari, S., Sharma, P., & HariKrishnaReddy, D. (2023). Insight into the emerging and common experimental in-vivo models of Alzheimer’s disease. *Laboratory Animal Research*, 39(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s42826-023-00184-1>
- Di Fede, G., Catania, M., Morbin, M., Rossi, G., Suardi, S., Mazzoleni, G., Merlin, M., Giovagnoli, A. R., Prioni, S., Erbetta, A., Falcone, C., Gobbi, M., Colombo, L., Bastone, A., Beeg, M., Manzoni, C., Francescucci, B., Spagnoli, A., Cantù, L., ... Tagliavini, F. (2009). A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5920), 1473–1477. <https://doi.org/10.1126/science.1168979>
- Di Giorgio, N. P., Bizzozzero-Hiriart, M., Surkin, P. N., Repetto, E., Bonaventura, M. M., Tabares, F. N., Bourguignon, N. S., Converti, A., Gomez, J. M. R., Bettler, B., & Lux-Lantos, V. (2023). Deletion of GABAB receptors from Kiss1 cells affects glucose homeostasis without altering reproduction in male mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 324(4), E314–E329. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00129.2022>
- Drzezga, A., Riemenschneider, M., Strassner, B., Grimmer, T., Peller, M., Knoll, A., Wagenpfeil, S., Minoshima, S., Schwaiger, M., & Kurz, A. (2005). Cerebral glucose metabolism in patients with AD and different APOE genotypes. *Neurology*, 64(1), 102–107. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000148478.39691.D3>
- Duarte, A. I., Moreira, P. I., & Oliveira, C. R. (2012). Insulin in central nervous system: More than just a peripheral hormone. *Journal of Aging Research*, 2012, 384017. <https://doi.org/10.1155/2012/384017>
- Elsworthy, R. J., Finelli, M. J., Aqattan, S., Dunleavy, C., King, M., Ludlam, A., Tarczyluk, M. A., Allen, S. L., Prosser, S., Chen, R., Jarquin, S. M., Kim, D. H., Brown, J., Parri, H. R., Aldred, S., & Hill, E. J. (2025). Altered metabolic function induced by Aβ-oligomers and PSEN1 mutations in iPSC -derived astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 169(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/jnc.16267>
- Ertekin-Taner, N. (2010). Genetics of Alzheimer disease in the pre- and post-GWAS era. *Alzheimer’s Research & Therapy*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/alzrt26>
- Estado de la Situación de Demencias. (n.d.). Retrieved June 22, 2025, from <https://pronadial.org.ar/estado-de-la-situacion-de-demencias/>
- Euser, S. M., Sattar, N., Witteman, J. C. M., Bollen, E. L. E. M., Sijbrands, E. J. G., Hofman, A., Perry, I. J., Breteler, M. M. B., Westendorp, R. G. J., & for PROSPER and the Rotterdam Study. (2010). A Prospective Analysis of Elevated Fasting Glucose Levels and Cognitive Function in Older

- People: Results From PROSPER and the Rotterdam Study. *Diabetes*, 59(7), 1601–1607. <https://doi.org/10.2337/db09-0568>
- Fernandez, A. M., Hernandez-Garzón, E., Perez-Domper, P., Perez-Alvarez, A., Mederos, S., Matsui, T., Santi, A., Trueba-Saiz, A., García-Guerra, L., Pose-Utrilla, J., Fielitz, J., Olson, E. N., Fernandez De La Rosa, R., Garcia Garcia, L., Pozo, M. A., Iglesias, T., Araque, A., Soya, H., Perea, G., ... Torres Aleman, I. (2017). Insulin Regulates Astrocytic Glucose Handling Through Cooperation With IGF-I. *Diabetes*, 66(1), 64–74. <https://doi.org/10.2337/db16-0861>
- Ferreira, L. S. S., Fernandes, C. S., Vieira, M. N. N., & De Felice, F. G. (2018). Insulin Resistance in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 830. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00830>
- Foidl, B. M., & Humpel, C. (2019). Can mouse models mimic sporadic Alzheimer's disease? *Neural Regeneration Research*, 15(3), 401–406. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.266046>
- Fontana, I. C., Scarpa, M., Malarte, M.-L., Rocha, F. M., Ausellé-Bosch, S., Bluma, M., Bucci, M., Chiotis, K., Kumar, A., & Nordberg, A. (2023). Astrocyte Signature in Alzheimer's Disease Continuum through a Multi-PET Tracer Imaging Perspective. *Cells*, 12(11), 1469. <https://doi.org/10.3390/cells12111469>
- Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H.-G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., Muschner, D., Thalheimer, A., Türk, A., Hoyer, S., Zöchling, R., Boissl, K. W., Jellinger, K., & Riederer, P. (1998). Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 105(4), 423–438. <https://doi.org/10.1007/s007020050068>
- Galvan, V., Gorostiza, O. F., Banwait, S., Ataie, M., Logvinova, A. V., Sitaraman, S., Carlson, E., Sagi, S. A., Chevallier, N., Jin, K., Greenberg, D. A., & Bredesen, D. E. (2006). Reversal of Alzheimer's-like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18), 7130–7135. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509695103>
- García-Cáceres, C., Fuente-Martín, E., Argente, J., & Chowen, J. A. (2012). Emerging role of glial cells in the control of body weight. *Molecular Metabolism*, 1(1–2), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2012.07.001>
- García-Cáceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C.-X., Le Thuc, O., Szigeti-Buck, K., Cai, W., Meyer, C. W., Pfluger, P. T., Fernandez, A. M., Luquet, S., Woods, S. C., Torres-Alemán, I., ... Tschöp, M. H. (2016).

- Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell*, 166(4), 867–880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.028>
- Geffken, S. J., Moon, S., Smith, C. O., Tang, S., Lee, H. H., Lewis, K., Wong, C. W., Huang, Y., Huang, Q., Zhao, Y.-T., & Cai, W. (2022). Insulin and IGF-1 elicit robust transcriptional regulation to modulate autophagy in astrocytes. *Molecular Metabolism*, 66, 101647. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101647>
- Genin, E., Hannequin, D., Wallon, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Bullido, M. J., Engelborghs, S., De Deyn, P., Berr, C., Pasquier, F., Dubois, B., Tognoni, G., Fiévet, N., Brouwers, N., Bettens, K., Arosio, B., Coto, E., Del Zompo, M., ... Campion, D. (2011). APOE and Alzheimer disease: A major gene with semi-dominant inheritance. *Molecular Psychiatry*, 16(9), 903–907. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.52>
- Goedert, M., & Ghetti, B. (2007). Alois Alzheimer: His Life and Times. *Brain Pathology*, 17(1), 57–62. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00056.x>
- González Pérez, N., Bellotto, M., Porte Alcón, S., Bentivegna, M., Arcucci, L., Vinuesa, Á., Presa, J., Brites, F., Pérez Sirkin, D., Beauquis, J., Saravia, F., & Pomilio, C. (2025). Metformin protects against insulin resistance-related dementia risk involving restored microglial homeostasis. *Life Sciences*, 378, 123803. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2025.123803>
- González-García, I., Gruber, T., & García-Cáceres, C. (2021). Insulin action on astrocytes: From energy homeostasis to behaviour. *Journal of Neuroendocrinology*, 33(4), e12953. <https://doi.org/10.1111/jne.12953>
- Gregosa, A., Vinuesa, Á., Todero, M. F., Pomilio, C., Rossi, S. P., Bentivegna, M., Presa, J., Wenker, S., Saravia, F., & Beauquis, J. (2019). Periodic dietary restriction ameliorates amyloid pathology and cognitive impairment in PDAPP-J20 mice: Potential implication of glial autophagy. *Neurobiology of Disease*, 132, 104542. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104542>
- Grieb, P. (2016). Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: In Search of a Relevant Mechanism. *Molecular Neurobiology*, 53(3), 1741–1752. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9132-3>
- Hampel, H., Hardy, J., Blennow, K., Chen, C., Perry, G., Kim, S. H., Villemagne, V. L., Aisen, P., Vendruscolo, M., Iwatsubo, T., Masters, C. L., Cho, M., Lannfelt, L., Cummings, J. L., & Vergallo, A. (2021). The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry*, 26(10), 5481–5503. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>

- Havrankova, J., Roth, J., & Brownstein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*, 272(5656), Article 5656. <https://doi.org/10.1038/272827a0>
- He, H., Zang, L.-H., Feng, Y.-S., Chen, L.-X., Kang, N., Tashiro, S., Onodera, S., Qiu, F., & Ikejima, T. (2013). Physalin A induces apoptosis via p53-Noxa-mediated ROS generation, and autophagy plays a protective role against apoptosis through p38-NF- κ B survival pathway in A375-S2 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(2), 544–555. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.051>
- Hendrix, R. D., Ou, Y., Davis, J. E., Odle, A. K., Groves, T. R., Allen, A. R., Childs, G. V., & Barger, S. W. (2021). Alzheimer amyloid- β - peptide disrupts membrane localization of glucose transporter 1 in astrocytes: Implications for glucose levels in brain and blood. *Neurobiology of Aging*, 97, 73–88. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.10.001>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Heni, M., Hennige, A. M., Peter, A., Siegel-Axel, D., Ordelheide, A.-M., Krebs, N., Machicao, F., Fritsche, A., Häring, H.-U., & Staiger, H. (2011). Insulin Promotes Glycogen Storage and Cell Proliferation in Primary Human Astrocytes. *PLoS ONE*, 6(6), e21594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021594>
- Heras-Sandoval, D., Pérez-Rojas, J. M., Hernández-Damián, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cellular Signalling*, 26(12), 2694–2701. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.08.019>
- Ho, L., Yemul, S., Knable, L., Katsel, P., Zhao, R., Haroutunian, V., & Pasinetti, G. M. (2012). Insulin Receptor Expression and Activity in the Brains of Nondiabetic Sporadic Alzheimer's Disease Cases. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 321280. <https://doi.org/10.1155/2012/321280>
- Hölscher, C. (2014). Insulin, incretins and other growth factors as potential novel treatments for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochemical Society Transactions*, 42(2), 593–599. <https://doi.org/10.1042/BST20140016>

- Hölscher, C. (2019). Insulin Signaling Impairment in the Brain as a Risk Factor in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 88. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00088>
- Ioannou, M. S., Jackson, J., Sheu, S.-H., Chang, C.-L., Weigel, A. V., Liu, H., Pasolli, H. A., Xu, C. S., Pang, S., Matthies, D., Hess, H. F., Lippincott-Schwartz, J., & Liu, Z. (2019). Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity. *Cell*, 177(6), 1522-1535.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.001>
- Ito, S., Sawada, M., Haneda, M., Ishida, Y., & Isobe, K. (2006). Amyloid-beta peptides induce several chemokine mRNA expressions in the primary microglia and Ra2 cell line via the PI3K/Akt and/or ERK pathway. *Neuroscience Research*, 56(3), 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.07.009>
- Jacob, C. P., Koutsilieri, E., Bartl, J., Neuen-Jacob, E., Arzberger, T., Zander, N., Ravid, R., Roggendorf, W., Riederer, P., & Grünblatt, E. (2007). Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 11(1), 97–116. <https://doi.org/10.3233/jad-2007-11113>
- Jayadev, S., Leverenz, J. B., Steinbart, E., Stahl, J., Klunk, W., Yu, C.-E., & Bird, T. D. (2010). Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain: A Journal of Neurology*, 133(Pt 4), 1143–1154. <https://doi.org/10.1093/brain/awq033>
- Johnson, E. C. B., Dammer, E. B., Duong, D. M., Ping, L., Zhou, M., Yin, L., Higginbotham, L. A., Guajardo, A., White, B., Troncoso, J. C., Thambisetty, M., Montine, T. J., Lee, E. B., Trojanowski, J. Q., Beach, T. G., Reiman, E. M., Haroutunian, V., Wang, M., Schadt, E., ... Seyfried, N. T. (2020). Large-scale proteomic analysis of Alzheimer's disease brain and cerebrospinal fluid reveals early changes in energy metabolism associated with microglia and astrocyte activation. *Nature Medicine*, 26(5), 769–780. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0815-6>
- Johnson, R. J., Tolan, D. R., Bredesen, D., Nagel, M., Sánchez-Lozada, L. G., Fini, M., Burtis, S., Lanasma, M. A., & Perlmutter, D. (2023). Could Alzheimer's disease be a maladaptation of an evolutionary survival pathway mediated by intracerebral fructose and uric acid metabolism? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 117(3), 455–466. <https://doi.org/10.1016/j.ajcnut.2023.01.002>
- Karran, E., & De Strooper, B. (2016). The amyloid cascade hypothesis: Are we poised for success or failure? *Journal of Neurochemistry*, 139(S2), 237–252. <https://doi.org/10.1111/jnc.13632>

- Kellar, D., & Craft, S. (2020). Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: Mechanisms and therapeutic approaches. *The Lancet. Neurology*, 19(9), Article 9. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30231-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30231-3)
- Kovacs, D. M., & Tanzi, R. E. (1998). Monogenic determinants of familial Alzheimer's disease: Presenilin-1 mutations. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 54(9), 902–909. <https://doi.org/10.1007/s000180050219>
- Kullmann, S., Kleinridders, A., Small, D. M., Fritsche, A., Häring, H.-U., Preissl, H., & Heni, M. (2020). Central nervous pathways of insulin action in the control of metabolism and food intake. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 8(6), 524–534. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30113-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30113-3)
- Kurochkin, I. V. (1998). Amyloidogenic determinant as a substrate recognition motif of insulin-degrading enzyme. *FEBS Letters*, 427(2), 153–156. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00422-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00422-0)
- Larner, A. J., & Doran, M. (2006). Clinical phenotypic heterogeneity of Alzheimer's disease associated with mutations of the presenilin-1 gene. *Journal of Neurology*, 253(2), 139–158. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0019-5>
- Lawrence, J. M., Schardien, K., Wigdahl, B., & Nonnemacher, M. R. (2023). Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: A systematic review. *Acta Neuropathologica Communications*, 11(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01526-9>
- Lee, J. H., Jahrling, J. B., Denner, L., & Dineley, K. T. (2018). Targeting Insulin for Alzheimer's Disease: Mechanisms, Status and Potential Directions. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 64(s1), S427–S453. <https://doi.org/10.3233/JAD-179923>
- Li, Q., & Haney, M. S. (2020). The role of glia in protein aggregation. *Neurobiology of Disease*, 143, 105015. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105015>
- Liddel, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Liu, R.-M. (2022). Aging, Cellular Senescence, and Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 1989. <https://doi.org/10.3390/ijms23041989>
- Liu, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Gong, C.-X. (2011). Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *The Journal of Pathology*, 225(1), 54–62. <https://doi.org/10.1002/path.2912>

- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda, S. G., Dias, A., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Kivimäki, M., Larson, E. B., Ogunniyi, A., ... Mukadam, N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet (London, England)*, 396(10248), 413–446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6)
- Lizarbe, B., Soares, A. F., Larsson, S., & Duarte, J. M. N. (2019). Neurochemical Modifications in the Hippocampus, Cortex and Hypothalamus of Mice Exposed to Long-Term High-Fat Diet. *Frontiers in Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00985>
- Luchsinger, J. A., Devanand, D., Goldberg, T. E., Cammack, S., Hernández-Santiago, G., Oishi, K., Jagust, W., Baker, S., Landau, S., Yenokyan, G., Betz, J., Mayers, S., Eyzaguirre, L. M., Hanley, D., & MAP Study Group. (2025). Protocol for a Randomized Phase II/III Double-Blind Placebo-Controlled Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of Extended-Release Metformin in Amnesic Mild Cognitive Impairment: Metformin in Alzheimer Dementia Prevention (MAP). *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 39(2), 123–133. <https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000677>
- Luchsinger, J. A., & Gustafson, D. R. (2009). Adiposity, type 2 diabetes, and Alzheimer’s disease. *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD*, 16(4), 693–704. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1022>
- Luo, A., Ning, P., Lu, H., Huang, H., Shen, Q., Zhang, D., Xu, F., Yang, L., & Xu, Y. (2022). Association Between Metformin and Alzheimer’s Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Observational Studies. *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD*, 88(4), 1311–1323. <https://doi.org/10.3233/JAD-220180>
- Mächler, P., Wyss, M. T., Elsayed, M., Stobart, J., Gutierrez, R., von Faber-Castell, A., Kaelin, V., Zuend, M., San Martín, A., Romero-Gómez, I., Baeza-Lehnert, F., Lengacher, S., Schneider, B. L., Aebischer, P., Magistretti, P. J., Barros, L. F., & Weber, B. (2016). In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell Metabolism*, 23(1), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.010>
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2015). A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron*, 86(4), 883–901. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.035>
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2018). Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule. *Nature Reviews. Neuroscience*, 19(4), 235–249. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.19>

- Martins, I. J., Hone, E., Foster, J. K., Sünram-Lea, S. I., Gnjec, A., Fuller, S. J., Nolan, D., Gandy, S. E., & Martins, R. N. (2006). Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Molecular Psychiatry*, 11(8), 721–736. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001854>
- Matthews, F. E., Stephan, B. C. M., Robinson, L., Jagger, C., Barnes, L. E., Arthur, A., & Brayne, C. (2016). A two decade dementia incidence comparison from the Cognitive Function and Ageing Studies I and II. *Nature Communications*, 7(1), 11398. <https://doi.org/10.1038/ncomms11398>
- Menéndez, M. (2004). Pathological and clinical heterogeneity of presenilin 1 gene mutations. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 6(5), 475–482. <https://doi.org/10.3233/jad-2004-6503>
- Miklossy, J., Taddei, K., Suva, D., Verdile, G., Fonte, J., Fisher, C., Gnjec, A., Ghika, J., Suard, F., Mehta, P. D., McLean, C. A., Masters, C. L., Brooks, W. S., & Martins, R. N. (2003). Two novel presenilin-1 mutations (Y256S and Q222H) are associated with early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(5), 655–662. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00192-6](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00192-6)
- Minoshima, S., Cross, D. J., Foster, N. L., Henry, T. R., & Kuhl, D. E. (1999). Discordance between traditional pathologic and energy metabolic changes in very early Alzheimer's disease. Pathophysiological implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893, 350–352. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07852.x>
- Minoshima, S., Giordani, B., Berent, S., Frey, K. A., Foster, N. L., & Kuhl, D. E. (1997). Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 42(1), 85–94. <https://doi.org/10.1002/ana.410420114>
- Mohandas, E., Rajmohan, V., & Raghunath, B. (2009). Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian Journal of Psychiatry*, 51(1), 55–61. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.44908>
- Moloney, A. M., Griffin, R. J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., & O'Neill, C. (2010). Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiology of Aging*, 31(2), 224–243. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.04.002>
- Monzio Compagnoni, G., Di Fonzo, A., Corti, S., Comi, G. P., Bresolin, N., & Masliah, E. (2020). The Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: The Lesson from Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 57(7), 2959–2980. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01926-1>

- Mookherjee, P., Green, P. S., Watson, G. S., Marques, M. A., Tanaka, K., Meeker, K. D., Meabon, J. S., Li, N., Zhu, P., Olson, V. G., & Cook, D. G. (2011). GLT-1 loss accelerates cognitive deficit onset in an Alzheimer's disease animal model. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 26(3), 447–455. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110503>
- Morgan, K. (2011). The three new pathways leading to Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 37(4), 353–357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01181.x>
- Morrison, R. S., Kinoshita, Y., Johnson, M. D., Ghatan, S., & Joseph. (2013). Neuronal Survival and Cell Death Signaling Pathways. In *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6319/>
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., & McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: Synaptotoxicity without plaque formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), Article 11.
- Muhič, M., Vardjan, N., Chowdhury, H. H., Zorec, R., & Kreft, M. (2015). Insulin and Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Modulate Cytoplasmic Glucose and Glycogen Levels but Not Glucose Transport across the Membrane in Astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(17), Article 17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.629063>
- Najem, D., Bamji-Mirza, M., Chang, N., Liu, Q. Y., & Zhang, W. (2014). Insulin resistance, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*, 25(4), 509–525. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2013-0050>
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8th ed.). National Academies Press (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
- Nedergaard, M., & Verkhratsky, A. (2012). Artifact versus reality—How astrocytes contribute to synaptic events. *Glia*, 60(7), 1013–1023. <https://doi.org/10.1002/glia.22288>
- Newington, J. T., Harris, R. A., & Cumming, R. C. (2013). Reevaluating Metabolism in Alzheimer's Disease from the Perspective of the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle Model. *Journal of Neurodegenerative Diseases*, 2013, 234572. <https://doi.org/10.1155/2013/234572>
- Nijland, P. G., Michailidou, I., Witte, M. E., Mizze, M. R., van der Pol, S. M. A., van Het Hof, B., Reijerkerk, A., Pellerin, L., van der Valk, P., de Vries, H. E., & van Horssen, J. (2014). Cellular

- distribution of glucose and monocarboxylate transporters in human brain white matter and multiple sclerosis lesions. *Glia*, 62(7), 1125–1141. <https://doi.org/10.1002/glia.22667>
- Nobili, F., Arbizu, J., Bouwman, F., Drzezga, A., Agosta, F., Nestor, P., Walker, Z., Boccardi, M., & Disorders, the E.-E. T. F. for the P. of F.-P. for D. N. (2018). European Association of Nuclear Medicine and European Academy of Neurology recommendations for the use of brain 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in neurodegenerative cognitive impairment and dementia: Delphi consensus. *European Journal of Neurology*, 25(10), 1201–1217. <https://doi.org/10.1111/ene.13728>
- Pádua, M. S., Guil-Guerrero, J. L., Prates, J. A. M., & Lopes, P. A. (2024). Insights on the Use of Transgenic Mice Models in Alzheimer's Disease Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ijms25052805>
- Pamies, D., Sartori, C., Schwartz, D., González-Ruiz, V., Pellerin, L., Nunes, C., Tavel, D., Maillard, V., Boccard, J., Rudaz, S., Sanchez, J.-C., & Zurich, M.-G. (2021). Neuroinflammatory Response to TNF α and IL1 β Cytokines Is Accompanied by an Increase in Glycolysis in Human Astrocytes In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4065. <https://doi.org/10.3390/ijms22084065>
- Patani, R., Hardingham, G. E., & Liddelow, S. A. (2023). Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. *Nature Reviews. Neurology*, 19(7), 395–409. <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00822-1>
- Peila, R., Rodriguez, B. L., Launer, L. J., & Honolulu-Asia Aging Study. (2002). Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes*, 51(4), 1256–1262. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.4.1256>
- Pepeu, G., & Giovannini, M. G. (2004). Changes in Acetylcholine Extracellular Levels During Cognitive Processes. *Learning & Memory*, 11(1), 21–27. <https://doi.org/10.1101/lm.68104>
- Qiu, W. Q., Walsh, D. M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M. B., Rosner, M. R., Safavi, A., Hersh, L. B., & Selkoe, D. J. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32730–32738. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32730>
- Raimundo, A. F., Ferreira, S., Martins, I. C., & Menezes, R. (2020). Islet Amyloid Polypeptide: A Partner in Crime With A β in the Pathology of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 35. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00035>

- Ralhan, I., Chang, C.-L., Lippincott-Schwartz, J., & Ioannou, M. S. (2021). Lipid droplets in the nervous system. *The Journal of Cell Biology*, 220(7), e202102136. <https://doi.org/10.1083/jcb.202102136>
- Reagan, L. P., Cowan, H. B., Woodruff, J. L., Piroli, G. G., Erichsen, J. M., Evans, A. N., Burzynski, H. E., Maxwell, N. D., Loyo-Rosado, F. Z., Macht, V. A., & Grillo, C. A. (2021). Hippocampal-specific insulin resistance elicits behavioral despair and hippocampal dendritic atrophy. *Neurobiology of Stress*, 15, 100354. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100354>
- Reger, M. A., Watson, G. S., Frey, W. H., Baker, L. D., Cholerton, B., Keeling, M. L., Belongia, D. A., Fishel, M. A., Plymate, S. R., Schellenberg, G. D., Cherrier, M. M., & Craft, S. (2006). Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: Modulation by APOE genotype. *Neurobiology of Aging*, 27(3), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.016>
- Reger, M. A., Watson, G. S., Green, P. S., Baker, L. D., Cholerton, B., Fishel, M. A., Plymate, S. R., Cherrier, M. M., Schellenberg, G. D., Frey, W. H., & Craft, S. (2008). Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid-beta in memory-impaired older adults. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 13(3), 323–331. <https://doi.org/10.3233/jad-2008-13309>
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., & Möbius, H. J. (2003). Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1333–1341. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013128>
- Rodriguez-Vieitez, E., Saint-Aubert, L., Carter, S. F., Almkvist, O., Farid, K., Schöll, M., Chiotis, K., Thordardottir, S., Graff, C., Wall, A., Långström, B., & Nordberg, A. (2016). Diverging longitudinal changes in astrogliosis and amyloid PET in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 139(Pt 3), 922–936. <https://doi.org/10.1093/brain/awv404>
- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Sorbi, S., Nacmias, B., Piacentini, S., Amaducci, L., Chumakov, I., Cohen, D., Lannfelt, L., Fraser, P. E., ... George-Hyslop, P. H. S. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376(6543), 775–778. <https://doi.org/10.1038/376775a0>

- Ruberg, M., Javoy-Agid, F., Hirsch, E., Scatton, B., Lheureux, R., Hauw, J.-J., Duyckaerts, C., Gray, F., Morel-Maroger, A., Rascol, A., Serdaru, M., & Agid, Y. (1985). Dopaminergic and cholinergic lesions in progressive supranuclear palsy. *Annals of Neurology*, 18(5), 523–529. <https://doi.org/10.1002/ana.410180503>
- Salas, I. H., & De Strooper, B. (2019). Diabetes and Alzheimer’s Disease: A Link not as Simple as it Seems. *Neurochemical Research*, 44(6), 1271–1278. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2690-9>
- Salvadó, G., Milà-Alomà, M., Shekari, M., Ashton, N. J., Operto, G., Falcon, C., Cacciaglia, R., Minguillon, C., Fauria, K., Niñerola-Baizán, A., Perissinotti, A., Benedet, A. L., Kollmorgen, G., Suridjan, I., Wild, N., Molinuevo, J. L., Zetterberg, H., Blennow, K., Suárez-Calvet, M., ... ALFA Study. (2022). Reactive astrogliosis is associated with higher cerebral glucose consumption in the early Alzheimer’s continuum. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 49(13), Article 13. <https://doi.org/10.1007/s00259-022-05897-4>
- Sato, Y., Falcone-Juengert, J., Tominaga, T., Su, H., & Liu, J. (2022). Remodeling of the Neurovascular Unit Following Cerebral Ischemia and Hemorrhage. *Cells*, 11(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/cells11182823>
- Scherer, T., Sakamoto, K., & Buettner, C. (2021). Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 17(8), 468–483. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00498-x>
- Schubert, M., Gautam, D., Surjo, D., Ueki, K., Baudler, S., Schubert, D., Kondo, T., Alber, J., Galldiks, N., Küstermann, E., Arndt, S., Jacobs, A. H., Krone, W., Kahn, C. R., & Brüning, J. C. (2004). Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 3100–3105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308724101>
- Schwartz, M. W., Figlewicz, D. F., Kahn, S. E., Baskin, D. G., Greenwood, M. R. C., & Porte, D. (1990). Insulin binding to brain capillaries is reduced in genetically obese, hyperinsulinemic Zucker rats. *Peptides*, 11(3), Article 3. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(90\)90044-6](https://doi.org/10.1016/0196-9781(90)90044-6)
- Scimemi, A., Meabon, J. S., Woltjer, R. L., Sullivan, J. M., Diamond, J. S., & Cook, D. G. (2013). Amyloid-β1-42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(12), 5312–5318. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5274-12.2013>

- Shigemori, K., Nomura, S., Umeda, T., Takeda, S., & Tomiyama, T. (2022). Peripheral A β acts as a negative modulator of insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(12), e2117723119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117723119>
- Smolič, T., Zorec, R., & Vardjan, N. (2021). Pathophysiology of Lipid Droplets in Neuroglia. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.3390/antiox11010022>
- Song, Y., Ding, W., Bei, Y., Xiao, Y., Tong, H.-D., Wang, L.-B., & Ai, L.-Y. (2018). Insulin is a potential antioxidant for diabetes-associated cognitive decline via regulating Nrf2 dependent antioxidant enzymes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 104, 474–484. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.097>
- Sripetchwandee, J., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2018). Links Between Obesity-Induced Brain Insulin Resistance, Brain Mitochondrial Dysfunction, and Dementia. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 496. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00496>
- Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2005a). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer’s disease—Is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD*, 7(1), 63–80. <https://doi.org/10.3233/jad-2005-7107>
- Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2005b). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer’s disease—Is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.3233/jad-2005-7107>
- Sunyer, B., Patil, S., Höger, H., & Luber, G. (2007). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.390>
- Swerdlow, R. H., Burns, J. M., & Khan, S. M. (2010). The Alzheimer’s disease mitochondrial cascade hypothesis. *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD*, 20 Suppl 2(Suppl 2), S265-279. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100339>
- Tabaton, M., & Tamagno, E. (2007). The molecular link between beta- and gamma-secretase activity on the amyloid beta precursor protein. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 64(17), 2211–2218. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7219-3>
- Takeda, K., Uda, A., Mitsubori, M., Nagashima, S., Iwasaki, H., Ito, N., Shiiba, I., Ishido, S., Matsuoka, M., Inatome, R., & Yanagi, S. (2021). Mitochondrial ubiquitin ligase alleviates Alzheimer’s disease pathology via blocking the toxic amyloid- β oligomer generation. *Communications Biology*, 4(1), 192. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01720-2>

- Talbot, K., Wang, H.-Y., Kazi, H., Han, L.-Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., Fuino, R. L., Kawaguchi, K. R., Samoyedny, A. J., Wilson, R. S., Arvanitakis, Z., Schneider, J. A., Wolf, B. A., Bennett, D. A., Trojanowski, J. Q., & Arnold, S. E. (2012). 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*, 122(4), 1316–1338. <https://doi.org/10.1172/JCI59903>
- Tanzi, R. E., & Bertram, L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell*, 120(4), 545–555. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.008>
- Theuns, J., Marjaux, E., Vandenbulcke, M., Van Laere, K., Kumar-Singh, S., Bormans, G., Brouwers, N., Van den Broeck, M., Vennekens, K., Corsmit, E., Cruts, M., De Strooper, B., Van Broeckhoven, C., & Vandenberghe, R. (2006). Alzheimer dementia caused by a novel mutation located in the APP C-terminal intracytosolic fragment. *Human Mutation*, 27(9), 888–896. <https://doi.org/10.1002/humu.20402>
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). *Physiology of Astroglia*.
- Vinuesa, A., Bentivegna, M., Calfa, G., Filipello, F., Pomilio, C., Bonaventura, M. M., Lux-Lantos, V., Matzkin, M. E., Gregosa, A., Presa, J., Matteoli, M., Beauquis, J., & Saravia, F. (2019). Early Exposure to a High-Fat Diet Impacts on Hippocampal Plasticity: Implication of Microglia-Derived Exosome-like Extracellular Vesicles. *Molecular Neurobiology*, 56(7), 5075–5094. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1435-8>
- Vinuesa, A., Pomilio, C., Menafrá, M., Bonaventura, M. M., Garay, L., Mercogliano, M. F., Schillaci, R., Lux Lantos, V., Brites, F., Beauquis, J., & Saravia, F. (2016). Juvenile exposure to a high fat diet promotes behavioral and limbic alterations in the absence of obesity. *Psychoneuroendocrinology*, 72, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.06.004>
- Wakabayashi, T., Yamaguchi, K., Matsui, K., Sano, T., Kubota, T., Hashimoto, T., Mano, A., Yamada, K., Matsuo, Y., Kubota, N., Kadowaki, T., & Iwatsubo, T. (2019). Differential effects of diet- and genetically-induced brain insulin resistance on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0315-7>
- Wallum, B. J., Taborsky, G. J., Porte, D., Figlewicz, D. P., Jacobson, L., Beard, J. C., Ward, W. K., & Dorsa, D. (1987). Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 64(1), 190–194. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-1-190>

- Wickelgren, I. (1998). Tracking insulin to the mind. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5363), 517–519.
<https://doi.org/10.1126/science.280.5363.517>
- Wijesekara, N., Gonçalves, R. A., De Felice, F. G., & Fraser, P. E. (2018). Impaired peripheral glucose homeostasis and Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 136(Pt B), Article Pt B.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.027>
- Willette, A. A., Bendlin, B. B., Starks, E. J., Birdsill, A. C., Johnson, S. C., Christian, B. T., Okonkwo, O. C., La Rue, A., Hermann, B. P., Kosciuk, R. L., Jonaitis, E. M., Sager, M. A., & Asthana, S. (2015). Association of Insulin Resistance With Cerebral Glucose Uptake in Late Middle-Aged Adults at Risk for Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, 72(9), 1013–1020.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.0613>
- Wimo, A., Jönsson, L., Bond, J., Prince, M., Winblad, B., & Alzheimer Disease International. (2013). The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 9(1), 1-11.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.006>
- Wright, A. L., Konen, L. M., Mockett, B. G., Morris, G. P., Singh, A., Burbano, L. E., Milham, L., Hoang, M., Zinn, R., Chesworth, R., Tan, R. P., Royle, G. A., Clark, I., Petrou, S., Abraham, W. C., & Vissel, B. (2023). The Q/R editing site of AMPA receptor GluA2 subunit acts as an epigenetic switch regulating dendritic spines, neurodegeneration and cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 18(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00632-5>
- Wu, T., Lin, D., Cheng, Y., Jiang, S., Riaz, M. W., Fu, N., Mou, C., Ye, M., & Zheng, Y. (2022). Amyloid Cascade Hypothesis for the Treatment of Alzheimer's Disease: Progress and Challenges. *Aging and Disease*, 13(6), 1745–1758. <https://doi.org/10.14336/AD.2022.0412>
- Xie, L., Helmerhorst, E., Taddei, K., Plewright, B., Van Bronswijk, W., & Martins, R. (2002a). Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(10), RC221.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-10-j0001.2002>
- Xie, L., Helmerhorst, E., Taddei, K., Plewright, B., Van Bronswijk, W., & Martins, R. (2002b). Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(10), RC221.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-10-j0001.2002>
- Xu, X., Sun, Y., Cen, X., Shan, B., Zhao, Q., Xie, T., Wang, Z., Hou, T., Xue, Y., Zhang, M., Peng, D., Sun, Q., Yi, C., Najafzadeh, A., & Xia, H. (2021). Metformin activates chaperone-mediated autophagy

- and improves disease pathologies in an Alzheimer disease mouse model. *Protein & Cell*, 12(10), 769–787. <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00858-3>
- Yang, J.-T., Wang, Z.-J., Cai, H.-Y., Yuan, L., Hu, M.-M., Wu, M.-N., & Qi, J.-S. (2018). Sex Differences in Neuropathology and Cognitive Behavior in APP/PS1/tau Triple-Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuroscience Bulletin*, 34(5), 736–746. <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0268-9>
- Yang, S., Magnutzki, A., Alami, N. O., Lattke, M., Hein, T. M., Scheller, J. S., Kröger, C., Oswald, F., Yilmazer-Hanke, D., Wirth, T., & Baumann, B. (2021). IKK2/NF- κ B Activation in Astrocytes Reduces amyloid β Deposition: A Process Associated with Specific Microglia Polarization. *Cells*, 10(10), 2669. <https://doi.org/10.3390/cells10102669>
- Yarchoan, M., Toledo, J. B., Lee, E. B., Arvanitakis, Z., Kazi, H., Han, L.-Y., Louneva, N., Lee, V. M.-Y., Kim, S. F., Trojanowski, J. Q., & Arnold, S. E. (2014). Abnormal serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 is associated with tau pathology in Alzheimer's disease and tauopathies. *Acta Neuropathologica*, 128(5), 679–689. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1328-5>
- Yin, F. (2023). Lipid metabolism and Alzheimer's disease: Clinical evidence, mechanistic link and therapeutic promise. *The FEBS Journal*, 290(6), 1420–1453. <https://doi.org/10.1111/febs.16344>
- Zhang, H., Jiang, X., Ma, L., Wei, W., Li, Z., Chang, S., Wen, J., Sun, J., & Li, H. (2022). Role of A β in Alzheimer's-related synaptic dysfunction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 964075. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.964075>
- Zhang, Y., Zhao, L., Wu, Z., Chen, X., & Ma, T. (2017). Galantamine alleviates senescence of U87 cells induced by beta-amyloid through decreasing ROS production. *Neuroscience Letters*, 653, 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.055>
- Zhang, Z., Song, M., Liu, X., Su Kang, S., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cao, X., Cheng, L., Sun, Y. E., Ping Yu, S., Jia, J., Levey, A. I., & Ye, K. (2015). Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 6, 8762. <https://doi.org/10.1038/ncomms9762>
- Zhao, W., De Felice, F. G., Fernandez, S., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., Krafft, G. A., & Klein, W. L. (2008). Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *The FASEB Journal*, 22(1), Article 1. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7703com>

Bibliografia

Zyśk, M., Beretta, C., Naia, L., Dakhel, A., Påvénius, L., Brismar, H., Lindskog, M., Ankarcrona, M., & Erlandsson, A. (2023). Amyloid- β accumulation in human astrocytes induces mitochondrial disruption and changed energy metabolism. *Journal of Neuroinflammation*, 20(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02722-z>