



Universidad  
Rey Juan Carlos

**GRADO EN BIOLOGÍA**  
**Curso Académico 2023/24**  
**Trabajo de Fin de Grado**

**Respuesta de la corteza cerebral a la leptina  
en un modelo murino de enfermedad del  
Alzheimer en estadios tempranos**

**Autor: Alejandro García Díaz**

**Directores: Teresa Fernández Agulló y Nuria Lauzurica Fernández**

# **ÍNDICE**

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>2.MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. MODELO ANIMAL.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2. ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE LA LEPTINA .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS .....</b>	<b>9</b>
<b>2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>10</b>
<b>3.RESULTADOS .....</b>	<b>10</b>
<b>4.DISCUSIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>5.CONCLUSIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>6.BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>15</b>
<b>7.ANEXO .....</b>	<b>17</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPK: Proteína cinasa activada por AMP

APOE: Apolipoproteína E

APP: Proteína precursora de amiloide

A $\beta$ : Beta amiloide

A $\beta$ 40: Beta amiloide 40

A $\beta$ 42: Beta amiloide 42

EA: Enfermedad de Alzheimer

ERK1: Quinasa 1 regulada por señal extracelular

ERK2: Quinasa 2 regulada por señal extracelular

GSK3 $\beta$ : Glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$

HRP: Enzima peroxidasa de rábano

ICV: Administración intracerebroventricular

JAK: Janus quinasa

JAK2: Janus quinasa 2

LepR: Receptor de leptina

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

PI3K: fosfatidilinositol-3-cinasa

PSEN1: Presenilina 1

PSEN2: Presenilina 2

PTP1B: Proteína tirosina fosfatasa 1B

SNC: Sistema nervioso central

SOCS3: Supresor de la señalización de citoquinas 3

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

## **RESUMEN**

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa progresiva y crónica que afecta principalmente a las funciones cognitivas, incluyendo la memoria, el pensamiento y el comportamiento. Actualmente, la OMS estima que 50 millones de personas sufren demencia, y entre el 60% y 70% de estos casos son EA.

En su desarrollo y progresión, además de, factores genéticos, la investigación sobre la EA ha revelado la importancia de varias proteínas y hormonas. La leptina, producida principalmente por los adipocitos, actuando en el sistema nervioso regula la neurogénesis y la plasticidad sináptica, la supresión del apetito y el aumento de la termogénesis, y también se ve implicada en la cognición.

En la EA, se ha observado que la resistencia a la leptina incrementa la acumulación de beta-amiloide y el deterioro cognitivo. Por ello, en este estudio propusimos estudiar la respuesta a la leptina en la corteza cerebral en ratones 5xFAD en edad temprana. El estudio se realizó en ratones de 3 meses de edad midiendo la activación de las proteínas involucradas en la señalización de leptina tras la estimulación aguda con leptina. Los resultados obtenidos indican que tanto la proteína AKT como la GSK3 presentan una tendencia a responder menos en los animales con EA que en los animales sin EA, sin alcanzar diferencias significativas, indicando así, que la funcionalidad de la vía de señalización de la leptina no parece estar comprometida en las primeras etapas de la enfermedad pero podría estar indicando el inicio del fallo de esta vía.

## **1.INTRODUCCIÓN**

En el siglo XIX, la demencia se trataba como una única enfermedad. Durante este período, Otto Binswanger y Alois Alzheimer comenzaron a desentrañar sus complejidades. (1) pero fue Alzheimer quien hizo un avance crucial al identificar una nueva condición clínica y patológica. En 1906, Alzheimer estudió a una paciente llamada Auguste Deter, quien presentaba síntomas como pérdida de memoria, desorientación y problemas de lenguaje. Tras su muerte, Alzheimer examinó su cerebro y descubrió anomalías que hoy se conocen como placas amiloides y ovillos neurofibrilares, los elementos más característicos de la enfermedad que, posteriormente Emil Kraepelin nombraría como enfermedad de Alzheimer (EA) (2,3). La Organización Mundial de la Salud indica que actualmente la prevalencia de la EA sigue aumentando y se estima que aproximadamente 50 millones de personas sufren demencia, de las cuales entre el 60% y 70% son casos de EA.

La EA es una condición neurodegenerativa progresiva y crónica que afecta principalmente las funciones cognitivas, incluyendo la memoria, el pensamiento y el comportamiento. Se distingue por la acumulación anormal de placas de proteína beta-amiloide ( $A\beta$ ) y ovillos neurofibrilares que están compuestos principalmente por la proteína *tau* hiperfosforilada, (4) lo que resulta en la pérdida de neuronas y una reducción en la actividad cerebral. Esto conduce al deterioro cognitivo y la pérdida de memoria, afectando negativamente la capacidad para llevar a cabo actividades de la vida diaria (5).

La EA tiene un componente genético importante, las mutaciones en los genes de la proteína precursora de  $A\beta$  (APP), de presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2) afectan a la producción y acumulación de la proteína  $A\beta$  en el cerebro, favoreciendo la formación de placas  $A\beta$ . APP al ser procesada por los complejos  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, produce el péptido  $A\beta$ . Por otro lado, las presenilinas forman la subunidad catalítica del complejo  $\gamma$ -secretasa. Se ha descrito que las mutaciones en PSEN1 modifican la actividad de la  $\gamma$ -secretasa, aumentando la proporción de  $A\beta_{42}$ , una variante del péptido especialmente tóxica y propensa a agregarse (6), en la EA de inicio temprano (7)

A parte de la EA familiar, conocida por su componente genético hereditario, existe la variante esporádica. Esta forma es la más prevalente, representando más del 90% de los casos y afectando principalmente a individuos sin antecedentes familiares directos. Diversos factores contribuyen al desarrollo de la EA esporádica, siendo la edad avanzada uno de los más significativos. (8)

Además de los factores genéticos, la investigación sobre la EA ha revelado la importancia de varias proteínas y hormonas en su desarrollo y progresión como por ejemplo la insulina y la leptina.

La leptina, que es una hormona proteica producida principalmente por los adipocitos que informa al cerebro sobre la cantidad de energía almacenada en forma de grasa, funcionando como una señal de saciedad. Su síntesis está regulada por señales fisiológicas y factores genéticos y aunque principalmente está producida por el tejido adiposo blanco en menor medida también la sintetizan otros tejidos como la placenta, los músculos esqueléticos y el estómago (9). Además, regula la ingesta de alimentos y el gasto energético (10), la leptina actúa en la neurogénesis y la plasticidad sináptica en el cerebro (11). Por otro lado, interviene en múltiples tejidos, ya que, tiene un impacto significativo en la función inmunitaria, regulando la actividad de macrófagos y linfocitos T; e incluso, influye en la reproducción, afectando a los órganos reproductivos y la fertilidad (12).

El receptor de la leptina (LepR) es un receptor de tipo citoquina de clase I presente en numerosas partes del cuerpo, incluido el cerebro. Se concentra principalmente en áreas del sistema nervioso central (SNC) como el hipotálamo, la corteza cerebral y el hipocampo (13). La leptina se une a su receptor y desencadena una cascada de eventos intracelulares que regulan la actividad neuronal (14).

La vía JAK2/STAT3 es fundamental en la señalización de la leptina. Cuando la leptina se une LepR activa la tirosina Janus quinasa 2 (JAK2) que fosforila la proteína transductora de señal y activadora de la transcripción 3 (STAT3), que dimeriza translocándose al núcleo celular. En el núcleo STAT3 regula la expresión de genes que son cruciales para la supresión del apetito y el aumento de la termogénesis principalmente en hipotálamo (13). Además, a través de JAK2 se produce la activación de la vía de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1 y ERK2, MAPK) y de la vía de la fosfoinositol-3-quinasa / proteína quinasa B (PI3K/AKT). Mediante la activación de las MAPK, la leptina induce proliferación y diferenciación celular. De aquí su implicación en las enfermedades neurodegenerativas, debido a el papel que tiene en la neuroplasticidad y la cognición (15).

Por otro lado, la activación de la vía PI3K/AKT, hace que la leptina promueva la síntesis de glucógeno y la inhibición de la apoptosis (16). Una vez activada la proteína AKT, fosforila GSK3 $\beta$ , inhibiendo su actividad. Esta inhibición es fundamental, ya que la hiperactividad de GSK3 $\beta$  contribuye a la hiperfosforilación de la proteína *tau* por lo que la leptina, ofrece un

mecanismo protector contra la neurodegeneración. Además, su regulación también puede influir en la producción y metabolismo del péptido A $\beta$  favoreciendo la regulación de la plasticidad sináptica y la formación de memoria (9).

La corteza cerebral, encargada de funciones cognitivas superiores como la memoria y el pensamiento, muestra una disminución en la sensibilidad de los receptores de leptina debido a la sobreexpresión de inhibidores como el supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3) y la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), al verse afectadas por la EA. Estos inhibidores se ven afectados en estados inflamatorios crónicos, lo que lleva a una disfunción en la señalización de dicha hormona. Este factor afecta tanto la estructura como la función de esta región cerebral, agravando la acumulación de A $\beta$ , la neurodegeneración y el deterioro cognitivo. (17,18,19)

Esta hormona ha suscitado un interés creciente en la investigación sobre la EA debido a sus efectos directos en el cerebro, tales como la promoción de la supervivencia neuronal, la modulación de la sinaptogénesis y la reducción de la acumulación de péptido A $\beta$  (20). En el hipocampo tiene un gran impacto en la neurogénesis (21) e incluso presenta propiedades anti-inflamatorias, que podrían contribuir a reducir la neuroinflamación y, por ende, el daño neuronal asociado (21,22). Investigaciones preclínicas en modelos animales han mostrado que la administración de leptina puede mejorar el desempeño cognitivo y reducir las cargas de A $\beta$  en el cerebro. Aunque los estudios clínicos en humanos son limitados, los resultados preliminares son prometedores y sugieren que la leptina podría ser una diana potencial en el desarrollo de nuevas terapias para la EA (23)

Considerando los efectos neurocognitivos de la leptina y su deterioro en la EA se plantea como hipótesis que en la corteza cerebral existirían alteraciones en las vías de señalización de la leptina durante la EA.

Para ello, se fijó como principal objetivo investigar en proteínas involucradas en la vía de señalización de la leptina en la corteza cerebral de un modelo murino con EA (5xFAD) en comparación con animales *wild type* en estadios tempranos.

El presente trabajo se alinea con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) número 3, que busca garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades. Adicionalmente, también apoya el ODS 4, promoviendo la educación de calidad mediante la generación y el ODS 9, fomentando la innovación en el campo de la biomedicina.

## **2.MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. MODELO ANIMAL**

Los ratones 5xFAD son un modelo animal ampliamente utilizado en la investigación de la EA familiar debido a su capacidad para replicar muchos de sus aspectos clave. Estos ratones son un modelo transgénico (creado en The Jackson Laboratory; Bar Harbor; Maine; EEUU) que sobreexpresan APP con tres mutaciones (K670N/M671L, I716V, y V717I) y PS1 con dos mutaciones (M146L y L286V), utilizando el promotor específico neuronal Thy1. Además, muestran niveles elevados de A $\beta$ 42, superando los niveles de A $\beta$ 40, por lo que la deposición de A $\beta$  se va a ver acelerada, de tal manera, que los déficits cognitivos van a aparecer a una edad temprana. (24).

La colonia de ratones 5xFAD se mantuvo en la Unidad veterinaria del campus de Alcorcón (CAT-URJC), como resultado del cruce entre hembras C57BL/6 WT y machos heterocigotos que presentan la EA (AD). Por ello, hay que genotipar la descendencia, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para separar los grupos AD de los grupos WT que se van a utilizar como los respectivos controles.

Los animales se mantuvieron con acceso *ad libitum* de agua y comida, ciclos de luz-oscuridad 12h -12h, temperatura (20-22°C) y humedad relativa (55-60%) controladas.

Todos los experimentos y procedimientos con los animales fueron realizados por personal autorizado y siguiendo la normativa de la Unión Europea y de la CAM. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la URJC, la Universidad de Barcelona y la CAM (Ref PROEX 001.8/23) y financiados con el proyecto de investigación PID2019-107738RB-I00 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Para el desarrollo de los experimentos se utilizaron 5 animales por cada grupo de ensayo.

### **2.2. ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE LA LEPTINA**

El efecto de la leptina en el cerebro se investiga mediante su administración intracerebroventricular (ICV). Para llevar a cabo este procedimiento, los ratones fueron ayunados 16 horas antes a la realización de la prueba y anestesiados con dolethal (pentobarbital sódico; Vetoquinol) fueron colocados en un estereotáxico para la administración de 2 $\mu$ L de suero salino o leptina (Sigma) en el ventrículo lateral derecho (bregma posterior -0,4mm, lateral -1mm, ventral -2,4mm) durante 30 minutos.

Posteriormente se sacrificaron por decapitación y se extrajeron tanto las muestras de cerebro, entre ellas la corteza derecha e izquierda de cada animal, como de otros tejidos de interés que se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### **2.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

En este trabajo utilizamos las cortezas del hemisferio cerebral izquierdo, en el que no se realizó la inyección. Se procedió a la extracción de proteínas totales homogenizando los tejidos en 1,5 ml del buffer de lisis (Tabla 2 Anexos) midiéndose la concentración de proteínas mediante el método Bradford y almacenándose a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **2.4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT**

La técnica analítica de Western Blot es utilizada para detectar y cuantificar proteínas específicas de una muestra al combinar la electroforesis en gel, la transferencia de proteínas a una membrana y la inmunodetección, permitiendo identificar proteínas de interés con alta precisión.

Las proteínas se separaron según su tamaño mediante electroforesis en gel de acrilamida/poliacrilamida al 10%, y se transfirieron a una membrana de PVDF.

Posteriormente, se prepararon las diluciones del anticuerpo primario (1/1000 en T-TBS-5% leche, 0.01% AcNa, excepto para los anticuerpos fosforilados que se incubaron en 5% BSA) (Tabla 1 Anexo) y se incubaron durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación. Tras varios lavados con T-TBS, se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (1/5000 en T-TBS-5% leche) (Tabla 1 Anexos). Para la cuantificación de la fosforilación tanto de AKT como de GSK3 en respuesta a leptina, los datos densimétricos de la proteína fosforilada (P-AKT y P-GSK3) se corrigieron con los de la proteína total (AKT y GSK3) y para la cuantificación de la cantidad total de la proteína total se utilizó como control de carga GAPDH.

Para detectar las proteínas se utilizó el reactivo Clarity (Bio-Rad) que al reaccionar con la enzima conjugada al anticuerpo secundario emite luminiscencia que fue detectada mediante el sistema de revelado "ChemiDoc™ MP Imaging System" (Bio-Rad). El software "Image J" (versión 1.45 s, National Institute of Health, Bethesda, EEUU) se utilizó para

realizar la densitometría de las bandas y así analizar la cantidad de proteína que se encontraba en cada muestra.

## **2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los resultados obtenidos en este estudio fueron evaluados empleando el software estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software, California, EE.UU.). Los datos se expresaron como la media con su error estándar (media  $\pm$  SEM) para cada grupo de ensayo. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para identificar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la fosforilación de GSK3 $\beta$  y AKT bajo distintas condiciones de tratamiento (SAL vs LEP) y entre diferentes genotipos (WT vs AD), así como la interacción entre estos factores. Posteriormente, se aplicó el test post hoc de Bonferroni tras la realización del ANOVA.

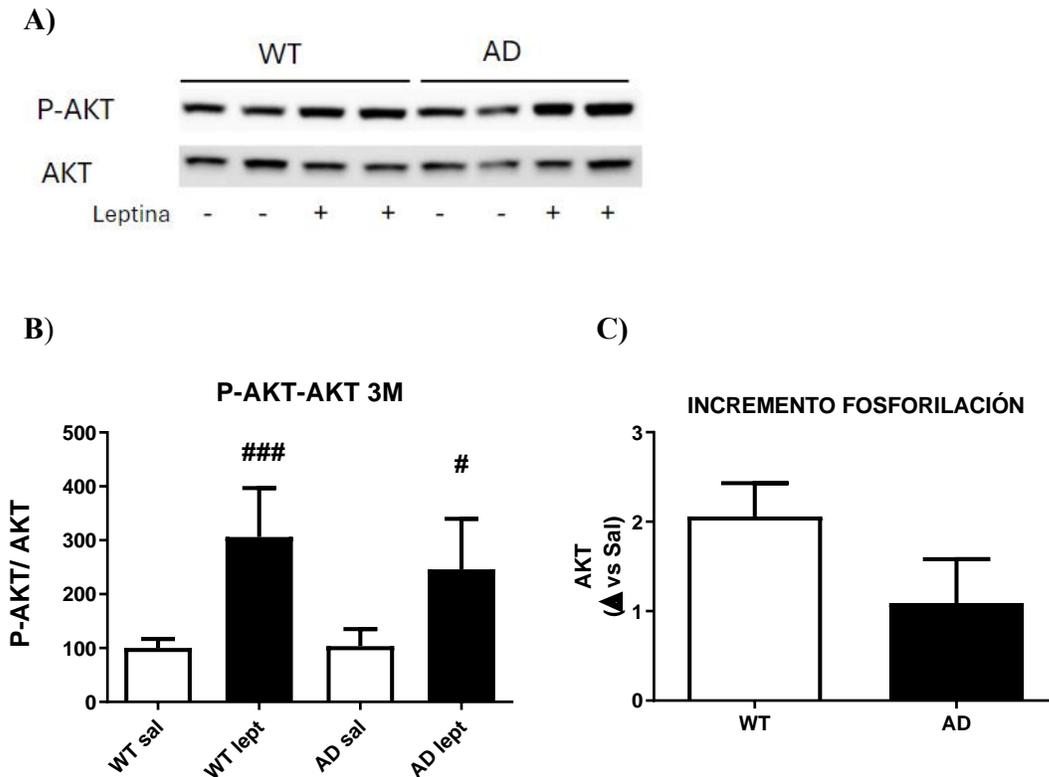
Para comparar las medias de dos grupos independientes y determinar la significancia estadística de las diferencias observadas ( $p < 0.05$ ), se utilizó la prueba t de Student (t-test). Este análisis permitió comparar el aumento en la fosforilación de AKT y GSK3 $\beta$  en respuesta a la leptina entre ratones WT y AD, así como la expresión total de estas proteínas.

## **3.RESULTADOS**

Con el fin de conocer la funcionalidad de la vía de señalización de la leptina en la corteza cerebral, se investigó la fosforilación de AKT y de GSK3 $\beta$  en ratones WT y AD de 3 meses sometidos a su administración ICV.

El tratamiento con leptina en ratones de 3 meses provoca un incremento significativo en la fosforilación de AKT (Figura 1A). Además, el análisis posttest indica que la leptina incrementa significativamente la fosforilación de ambas proteínas tanto el grupo WT como el grupo AD. (Figura 1B)

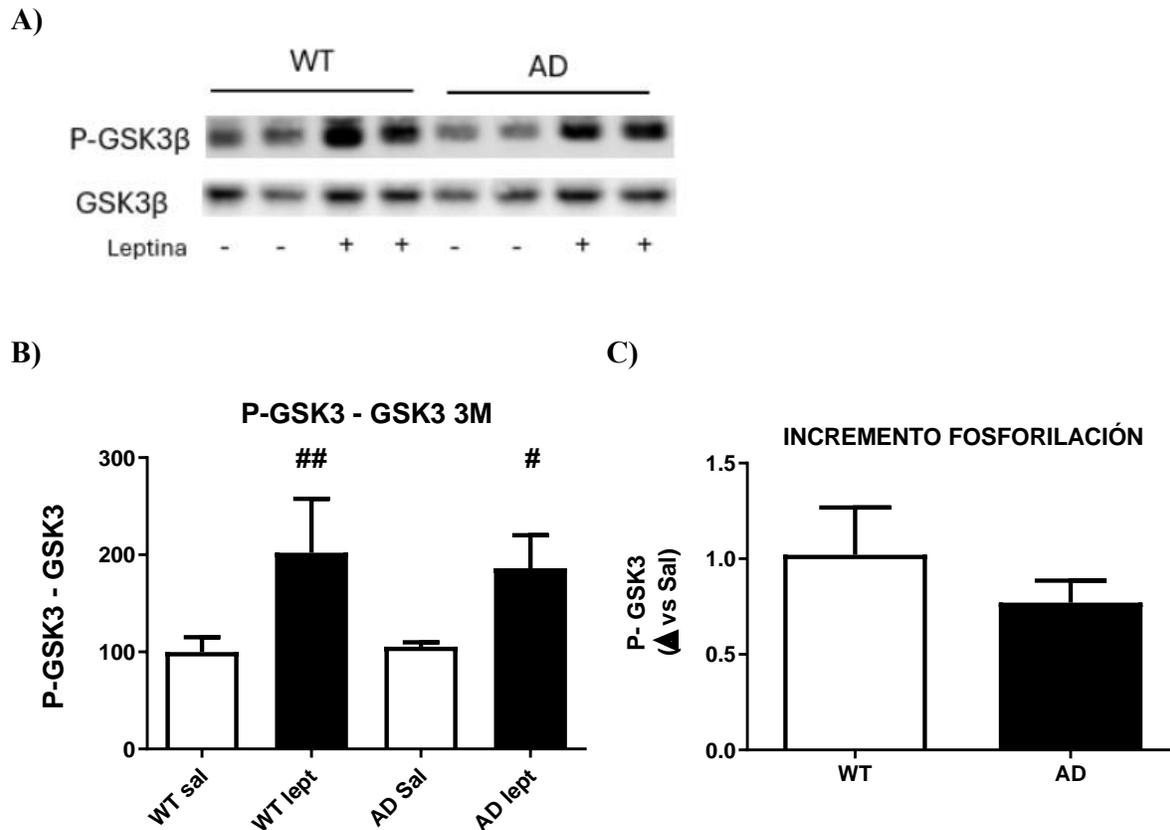
Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos ni una interacción entre genotipo y tratamiento, lo que indica que los ratones WT y los AD respondieron del mismo modo al tratamiento con leptina. Asimismo, no se detectaron diferencias significativas en los incrementos de fosforilación en respuesta a la leptina entre los dos grupos (Figuras 1B) aunque se aprecia una clara tendencia a una menor respuesta en los ratones AD.



**Figura 1. Respuesta de AKT a leptina en corteza cerebral de ratones WT y AD de 3 meses de edad.** **A.** Western blot representativo. **B.** Cuantificación de la fosforilación de AKT (P-AKT) respecto a los niveles totales de AKT tras la administración icv de salino o leptina en ratones wild type (WT) o 5XFAD (AD). **C.** Incremento de P-AKT entre los animales tratados con leptina respecto a sus correspondientes salinos en cada genotipo. Anova de dos vías, post-hoc Bonferroni, ### $p < 0.001$  vs. SAL; # $p < 0.05$  vsSAL.

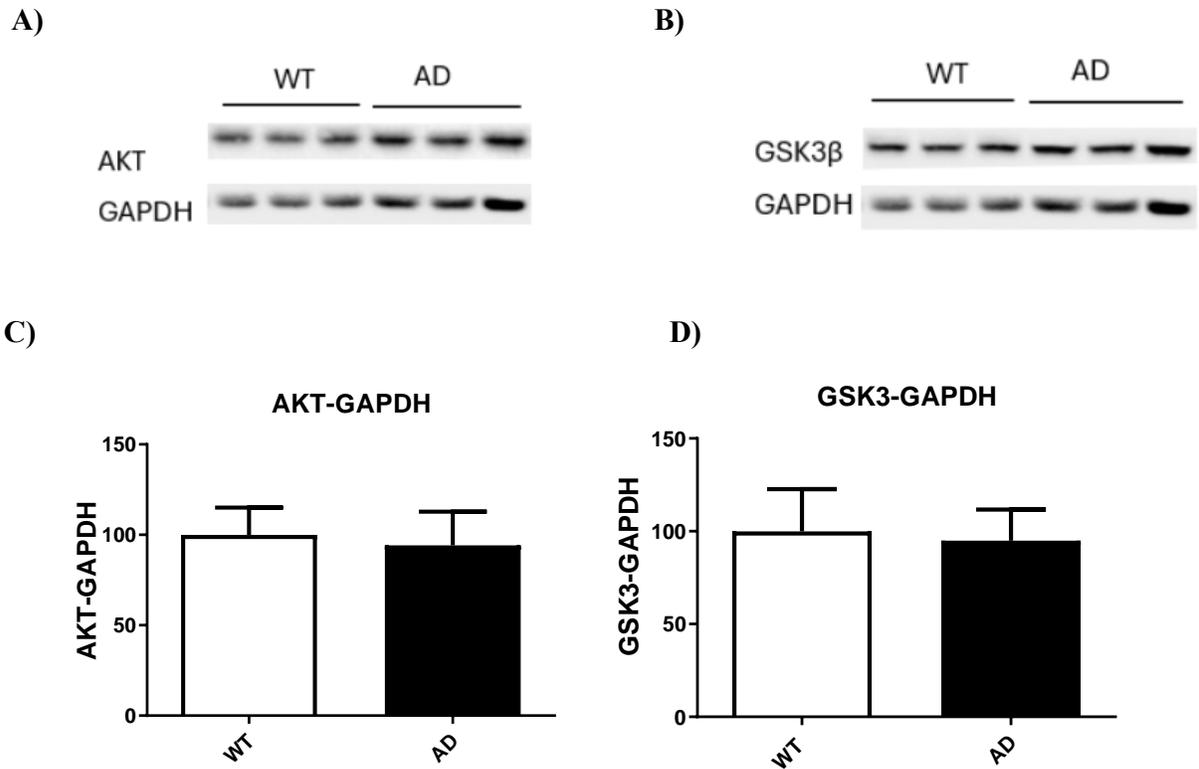
En el caso de GSK3 $\beta$  el tratamiento con leptina en ratones de 3 meses provoca un incremento significativo en la fosforilación de GSK3 (Figura 1A). Además, el análisis posttest indica que la leptina incrementa significativamente la fosforilación de ambas proteínas tanto el grupo WT como el grupo AD. (Figura 2B)

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos ni una interacción entre genotipo y tratamiento, lo que indica que los ratones WT y los AD respondieron del mismo modo al tratamiento con leptina. Asimismo, no se detectaron diferencias significativas en los incrementos de fosforilación en respuesta a la leptina entre los dos grupos (Figuras 2B) aunque, al igual que en la anterior, proteína se aprecia una tendencia a una menor respuesta en los ratones AD.



**Figura 2. Respuesta de GSK3 a leptina en corteza cerebral de ratones WT y AD de 3 meses de edad.** A. Western blot representativo. B. Cuantificación de la fosforilación de GSK3  $\beta$  (P-GSK3 $\beta$ ) respecto a los niveles totales de AKT tras la administración icv de salino o leptina en ratones *wild type* (WT) o 5XFAD (AD). C. Incremento de P-GSK3 entre los animales tratados con leptina respecto a sus correspondientes salinos en cada genotipo. Anova de dos vías, post-hoc Bonferroni, ## $p < 0.001$  vs. SAL; # $p < 0.05$  vsSAL.

Al analizar la expresión proteica de AKT y GSK3 utilizando GAPDH como control de carga (Figura 3 C y D) no se encontraron diferencias significativas entre ambos genotipos.



**FIGURA 3. Expresión proteica de AKT y GSK3 en corteza cerebral de ratones WT y AD de 3 meses de edad. A y B.** Western blot representativo. **C.** Cuantificación de AKT en función del control de carga GAPDH. **B.** Cuantificación de AKT en función del control de carga GAPDH.

#### **4.DISCUSIÓN**

Este estudio se propuso investigar en estadios tempranos de la EA posibles cambios en la activación de la vía de señalización de la leptina y/o en la expresión de sus proteínas utilizando el modelo murino 5XFAD y sus correspondientes controles WT, a los 3 meses de edad.

Nuestros resultados indican que, en los ratones con EA (WT), se produce la activación de la vía de señalización, medida a través de la fosforilación de AKT y GSK3, se produce de forma similar que en los ratones WT, lo que sugiere que la funcionalidad de esta vía todavía permanece intacta en esta etapa temprana de la enfermedad.

El análisis del incremento de fosforilación de ambas proteínas entre los dos genotipos, aunque no muestra diferencias significativas, si se observa una tendencia a una menor respuesta en los ratones 5xFAD. Este hallazgo es consistente con el trabajo de Zhang et

al. (2009), quienes demostraron que la disfunción en la señalización de GSK3 y AKT puede ser un evento temprano en la patogénesis de la EA, pero que sus efectos pueden volverse más pronunciados en etapas más avanzadas de la enfermedad. El hecho de haber encontrado solo una tendencia se puede deber a haber utilizado un número pequeño de animales con resultados dispersos. Cabría la posibilidad de tener resultados más significativos ampliando el tamaño muestral.

Estudios previos, como el de Farr et al. (10) han demostrado que la administración de leptina mejora la memoria en ratones. Además, investigaciones preclínicas en modelos animales han mostrado que la administración de leptina puede mejorar el desempeño cognitivo, aunque los estudios clínicos en humanos son limitados.

Los estudios de Tang y Kumar (20) propusieron que la leptina juega un papel dual en la neuroprotección y la neurodegeneración ya que no solo promueve la supervivencia neuronal y reduce la apoptosis en modelos animales, sino que también regula varias vías de señalización celular que son críticas para el buen funcionamiento. Otros autores, indican que la leptina presenta propiedades antiinflamatorias, lo cual sugiere que podría ser un modulador clave en la protección neuronal frente a procesos degenerativos (19).

Finalmente, estudios previos han mostrado que la leptina puede regular la producción de  $\beta$ -amiloide y la fosforilación de la proteína tau (10,18,19). Estas funciones son cruciales, ya que la acumulación de  $\beta$ -amiloide y la hiperfosforilación de tau están fuertemente asociadas con la patogénesis de la EA.

Las futuras líneas de investigación deben considerar que la leptina ofrece posibles intervenciones terapéuticas en la EA. Además, se ha observado que la leptina favorece el almacenamiento de energía mediante la disminución de la ingesta de alimentos (17), lo que puede tener implicaciones adicionales en el manejo de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas.

## **5.CONCLUSIÓN**

Este estudio muestra que la funcionalidad de la vía de señalización de la leptina no parece estar comprometida en las primeras etapas de la enfermedad. El hecho de observarse una menor tendencia a disminuir la respuesta en los animales 5xFAD podría estar indicando el inicio del fallo de esta vía. Estos hallazgos subrayan la necesidad de profundizar en la relación entre la resistencia a la leptina y la progresión de la EA, de tal manera, que los

futuros estudios deberán enfocarse en evaluar la funcionalidad de esta vía de señalización en diversas fases de la enfermedad así como explorar intervenciones que puedan mejorar la sensibilidad a la leptina y mitigar los efectos neurodegenerativos asociados a la EA.

## **6.BIBLIOGRAFIA**

1. Binswanger O. Die Abgrenzung der allgemeinen progressiven Paralyse von der multiplen Hirnerkrankung. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*. 1894;26(1):171-228.
2. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*. 1907;64(1-2):146-148.
3. García S, Vázquez RMC, Dávalos EM, Castillo JL, Silva BM, Ortiz ADJV. Enfermedad de Alzheimer: una panorámica desde su primera descripción hacia una perspectiva molecular. *Medicina Interna de México*. 2009;25(4):300-312.
4. Guo T, Hong S, Wang X, et al. Tau in Alzheimer's Disease: Pathological Alterations and an Attractive Therapeutic Target. *Curr Med Sci*. 2024. doi:10.1007/s11596-023-2601-5.
5. Alzheimer's Association. 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2022;18(3).
6. Lanoiselée HM, Nicolas G, Wallon D, Rovelet-Lecrux A, Lacour M, Rousseau S, et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS medicine*. 2017;14(3)
7. Scheuner D, et al. Secreted amyloid  $\beta$ -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine*. 1996;2:864-870.
8. Dutchen S. Sporadic Alzheimer's in a Dish. Harvard Medical School. January 29, 2019.
9. Zhang X, Wu L, Liu N. The critical role of GSK-3 $\beta$  in regulating the processing of APP induced by insulin deficiency. *Molecular Neurodegeneration*. 2009;4(1):56.
10. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395(6704):763-770.
11. Farr SA, Banks WA, Morley JE. Effects of leptin on memory processing. *Peptides*. 2006;27(6):1420-1425.

12. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annual Review of Physiology*. 2000;62:413-437.
13. Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, et al. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nature Genetics*. 1996;14(1):95-97.
14. Munzberg H, Myers MG Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nature Neuroscience*. 2005;8(5):566-570.
15. Rahmouni K, Sigmund CD, Haynes WG, Mark AL. Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes*. 2009;58(3):536-542.
16. Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG Jr, Schwartz MW. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature*. 2001;413(6858):794-795.
17. Amandine J, Szu JI, Quan R, et al. Cortical cerebrovascular and metabolic perturbations in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2023;15:1220036. doi:10.3389/fnagi.2023.1220036
18. Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A $\beta$ 42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener*. 2012;7:2.
19. Zhang Y, Wang Y, Liu L, et al. Altered Brain Leptin and Leptin Receptor Expression in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurodegener*. 2020;15(1):1-15.
20. Fewlass DC, Noboa K, Pi-Sunyer FX, Johnston JM, Yan SD, Tezapsidis N. Leptin regulates amyloid-beta production and tau phosphorylation. *Neurobiology of Aging*. 2004;25(4):457-462.
21. Tang BL, Kumar R. The role of leptin in neuroprotection and neurodegeneration. *Current Neuropharmacology*. 2012;10(2):237-246.
22. Bonda DJ, Stone JG, Torres SL, et al. Leptin and Alzheimer's disease: An intriguing link. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2014;40(8):1048-1056.
23. Mele BS, Holsinger RM, Lau PL, Rajakumar N. Leptin: Potential role in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2019;68(1):63-75. DOI: 10.3233/JAD-181124.

24. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26(40):10129-10140

## **7.ANEXO**

<b>Anticuerpo primario</b>		
<b>Anticuerpo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
P-AKT	Santa cruz	7985R
P-GSK3	Cell signaling	93365
P-STAT3	Cell signaling	91455
AKT	Santa cruz	8312
GSK3	BD Biosciences	610201
STAT3	Cell signaling	91395
GAPDH	abcam	AB8245
$\beta$ -actina	Sigma	-
<b>Anticuerpo secundario</b>		
Goat Anti-Rabbit	Bio-Rad	170-6515

TABLA 1. Anticuerpos utilizados en Western Blot.

<b>Buffer de lisis</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Composición</b>	<b>Casa comercial</b>
Tris(hydroxymethyl)aminometane, 99'8%, for analysis, biochemical grade	50mM Tris	Acros organics
Sodium fluoride, sigmaUltra, minimum 99%	50mM NaF	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, sigma grade	1mM EDTA	Sigma
Ethylene glycol-bis( 2- amino- ethylether)- N, N, N', N'- tetra- acetic acid	1mM EGTA	Sigma
Sodium orthovanadate, minimum 90% tritacion	100mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma
Triton tm X-100 for molecular biology	1% Tritón X-100 (liq)	Sigma
B-glicerol phosphate disodium salt pentahydrate	10mM βGlicerol	Fluka
Sodium pyrophosphate tetrabasics, minimum 95%	5mM pirofosfato sódico	Sigma
<b>TTBS</b>		
Tris(hydroxymethyl)aminometane, 99'8%, for analysis, biochemical grade	10mM Tris	Acros organics
Sodium chloride	150mM NaCl	Sigma
Tween 20	0,1% Tween 20 (liq)	Sigma

TABLA 2. Buffers utilizados en western blot