

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 041 902**

(51) Int. Cl.:

<b>A61K 31/075</b>	(2006.01)	<b>A61P 9/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/05</b>	(2006.01)	<b>A61P 9/12</b>	(2006.01)
<b>A61P 19/02</b>	(2006.01)	<b>A61P 19/10</b>	(2006.01)
<b>A61P 25/16</b>	(2006.01)	<b>A61P 3/06</b>	(2006.01)
<b>A61P 25/28</b>	(2006.01)	<b>A23L 33/125</b>	(2006.01)
<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 1/16</b>	(2006.01)		
<b>A61P 5/06</b>	(2006.01)		
<b>A61P 3/10</b>	(2006.01)		

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2020 PCT/EP2020/075180**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2021 WO21048195**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2020 E 20780933 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2025 EP 4045022**

(54) Título: **Composición para prevenir y tratar taupatías**

(30) Prioridad:

**09.09.2019 EP 19382778**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.11.2025**

(73) Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (47.00%)**  
**Avda. de la Constitución 18**  
**41071 Sevilla, ES;**  
**EURONUTRA, S.L. (50.00%) y**  
**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (3.00%)**

(72) Inventor/es:

**RODRIGUEZ DE FONSECA, FERNANDO;**  
**NAVARRO GALERA, JUAN ANTONIO;**  
**BAIXERAS LLANO, ELENA;**  
**DECARA DEL OLMO, JUAN MANUEL;**  
**MEDINA VERA, DINA;**  
**LÓPEZ GAMBERO, ANTONIO JESÚS;**  
**SUAREZ PEREZ, JUAN;**  
**SANJUAN MERINO, CARLOS;**  
**ROSELL DEL VALLE, CRISTINA y**  
**PAVÓN MORÓN, FRANCISCO JAVIER**

(74) Agente/Representante:

**QUIRÓS MARÍN, María**

**ES 3 041 902 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composición para prevenir y tratar taupatías

**5 Campo de la invención**

Esta invención se refiere a la administración de una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende D-pinitol o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos, enfermedades o afecciones que responden a la estimulación del receptor de grelina en un sujeto que lo necesita.

**Antecedentes de la invención**

El proceso de envejecimiento en humanos está asociado con el debilitamiento físico y el deterioro de la homeostasis metabólica (1). Aunque el debilitamiento físico tiene una expresión relevante sobre el aumento de la fragilidad y el desarrollo de sarcopenia, una pérdida generalizada de masa muscular y rendimiento de las células musculares, la desregulación de la red metabólica conduce a un aumento relacionado con la edad de obesidad, resistencia a la insulina, diabetes e hipertensión (2). El envejecimiento altera la actividad de las rutas de señalización metabólica clave y la desregulación metabólica resultante da como resultado un envejecimiento acelerado. Por tanto, la asociación de decrepitud, homeostasis metabólica deteriorada e hipertensión aumenta la vulnerabilidad y limita la calidad de vida y, de hecho, la esperanza de vida de los ancianos.

Un sistema de señalización clave alterado en el envejecimiento es la señalización de insulina. El deterioro relacionado con la edad en la actividad de la ruta de señalización de insulina da como resultado resistencia a la insulina (1). La hiperglucemia resultante, como resultado de una eliminación de glucosa desregulada, fomenta la formación de productos finales de la glucación avanzada (AGE), que a su vez provocan daños en los tejidos agravando adicionalmente la desregulación metabólica y acelerando el proceso de envejecimiento. Un bucle hepatomuscular clave se ve profundamente afectado por el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina, donde el acoplamiento entre la producción de glucosa hepática y el consumo de glucosa por el músculo está desregulado como resultado del deterioro en la señalización de insulina que conduce a la sobreproducción de glucosa hepática, mientras inhibe su utilización por el músculo, ya afectado por la decrepitud asociada con el envejecimiento (1).

Entre las diferentes rutas de señalización metabólica que controlan la homeostasis de energía y la vitalidad muscular, la grelina, una hormona peptídica producida por células especializadas en el tracto gastrointestinal, surge como una diana potencial para la decrepitud y la desregulación metabólica asociada con la edad (3-5). La grelina es capaz de fomentar el apetito, inhibir la secreción de insulina, aumentar la liberación de hormona del crecimiento, potenciar la vitalidad muscular aumentando la masa muscular neta, y mejorar la capacidad intelectual (6-9). Si se considera que el envejecimiento produce pérdida de apetito, secreción excesiva de insulina, resistencia a la insulina, decrepitud muscular y deterioro cognitivo, los efectos fisiológicos de la grelina se sitúan para combatir todas estas afecciones asociadas con la edad. Por tanto, se ha propuesto que potenciar la liberación de grelina o la administración de agonistas del receptor de grelina se use como un método para combatir las afecciones asociadas con la edad citadas anteriormente (5), incluyendo hipertensión, dado que la disminución de los niveles de grelina está asociada positivamente a la hipertensión relacionada con la edad (10). ORR MIRANDA E *et al.*: "A Brief Overview of Tauopathy: Causes, Consequences, and Therapeutic Strategies", TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARTH, GB, vol. 38, n.º 7, 25 de abril de 2017, divulga taupatías, incluyendo encefalopatía traumática crónica, enfermedad de Pick, degeneración corticobasal, y parálisis supranuclear progresiva, junto con estrategias para su tratamiento usando agentes tales como donepezilo, rivastigmina, y memantina, etc.

**50 Breve descripción de la invención**

La presente invención se refiere a una composición, preferiblemente a una composición farmacéutica o a una composición nutracéutica o alimenticia, que comprende D-pinitol o cualesquiera sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso en la prevención o ralentización del inicio de una taupatía en un sujeto, en donde la taupatía se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de granos argirófilos, taupatías gliales globulares, taupatía primaria relacionada con la edad que incluye demencia con ovillos neurofibrilares, encefalopatía traumática crónica (ETC), y astrogliopatía tau relacionada con el envejecimiento.

60 En una realización, la composición es una composición farmacéutica que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la composición es un suplemento dietético.

65 En otra realización, la composición es un suplemento dietético.

En otra realización, la composición es una composición nutracéutica.

En otra realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones previas, la composición se administra por vía oral o por vía intragástrica.

5 En aún otra realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las realizaciones previas, la composición se administra a un sujeto sano que no padece ninguna manifestación clínica de una taupatía o de deterioro cognitivo leve.

10 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier contenido que se encuentre fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con propósitos de información. Las referencias a métodos de tratamiento en esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, a las composiciones farmacéuticas y a los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

15 15 En el contexto de la presente invención, "niveles de referencia preprandiales normales" se entienden como niveles de referencia preprandiales en un sujeto sano. Se comentan los niveles de grelina en plasma en European Endocrinology, 2015;11(2):90-5 DOI: 10.17925/EE.2015.11.02.90, entre otros.

20 20 En el contexto de la presente invención, "grelina activa" se entiende como la forma acilada (habitualmente n-octanoilada) de grelina. Se genera como una esterificación postraduccional de un ácido graso (n-octanoico o, en menor medida, n-decanoico) en el residuo de serina en la posición 3 en la grelina secretada. Esta acilación es necesaria para la actividad de grelina.

25 25 En el contexto de la presente invención, "afecciones relacionadas con la edad" se entiende como cualquier cambio fisiológico o trastorno patológico que se observa más a menudo con senescencia aumentada. Los cambios fisiológicos normales asociados con el envejecimiento incluyen pérdida de masa muscular y decrepitud muscular aumentada o deterioro cognitivo leve. Los trastornos patológicos cuya prevalencia aumenta exponencialmente con la edad incluyen: ateroesclerosis, enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2, osteoporosis, hipertensión, enfermedad de Alzheimer, artritis, cataratas y cáncer.

30 30 En el contexto de la presente invención, "sarcopenia" se define como la pérdida de masa y fuerza del músculo esquelético como resultado del envejecimiento.

35 35 En el contexto de la presente invención, "hipertensión relacionada con la edad" se entiende como el aumento de la tensión arterial sistólica asociado con la edad derivado del aumento asociado con la edad de la resistencia total (y vascular renal) como consecuencia de la pérdida progresiva de las propiedades viscoelásticas de los vasos de los conductos, enfermedad arterial ateroesclerótica aumentada, e hipertrofia y esclerosis de arterias y arteriolas musculares.

#### 40 Breve descripción de las figuras

Sólo las figuras referentes al D-pinitol reivindicado en el presente documento forman parte de la presente invención. Las figuras referentes a otros inositoles son figuras de referencia.

45 45 Figura 1. Estructura y relación de D-pinitol ((1S,2S,4S,5R)-6-metoxiciclohexano-1,2,3,4,5-pentol), D-quirosinitol ((1R,2R,3S,4S,5S,6S)-ciclohexano-1,2,3,4,5,6-hexol) y D-mioinositol ((1R,2S,3R,4R,5S,6S)-ciclohexano-1,2,3,4,5,6-hexol). Los inositoles son polialcoholes con propiedades miméticas a la insulina. El D-pinitol procedente de fuentes naturales (es decir, fruto del algarrobo) puede desmetilarse en el medio ácido del estómago para convertirse en D-quirosinitol. Además, otro inositol encontrado en la dieta es un isómero de D-quirosinitol que puede convertirse en D-quirosinitol por medio de la acción enzimática de una epimerasa.

50 50 Figura 2. Tal como se muestra en figura 2, la administración oral de pinitol (100 mg/kg) disuelto en agua estéril a ratas Wistar macho adultas da como resultado a) un aumento de la concentración de grelina en plasma circulante que está asociado con B) liberación disminuida de insulina a la circulación sanguínea, C) reducción de la resistencia a la insulina medida mediante el índice HOMA, y D) inhibición de la expresión de piruvato cinasa, una enzima clave para desviar fosfoenolpiruvato a la producción de glucosa.

55 60 Figura 3. Tal como se muestra en figura 3, la administración oral de pinitol (500 mg/kg) a ratas Wistar macho adultas da como resultado A) un aumento de la concentración de grelina en plasma circulante que está asociado con B) liberación disminuida de insulina a la circulación sanguínea, C) mantenimiento de los niveles de glucosa en plasma, D) reducción de la resistencia a la insulina medida mediante el índice HOMA, E) aumento de la secreción de glucagón y F) activación de la señalización hipotalámica de mTOR en el hipotálamo a través de su fosforilación.

65 65 Figura 4. Tal como se muestra en figura 4, la administración oral de D-quirosinitol (500 mg/kg) potencia la secreción de grelina tal como se mide a través de la monitorización de concentraciones de grelina en plasma circulante.

Figura 5. Ilustra un modelo de acción propuesto de los inositoles en el envejecimiento metabólico. O bien D-pinitol o bien D-quiroinositol potencia la secreción de grelina y fomenta una situación metabólica caracterizada por una demanda reducida de insulina desde el páncreas endocrino, neoglucogénesis en el hígado, uso muscular potenciado de glucosa con crecimiento muscular asociado, y señalización de mTOR potenciada en el hipotálamo que conduce a un aumento del apetito. Las consecuencias generales de este singular perfil farmacológico pueden incluir la protección del páncreas frente al agotamiento derivado de la obesidad y la resistencia a la insulina asociada con la edad, vitalidad muscular potenciada (que previene la sarcopenia y la decrepitud características de los ancianos) y un mejor direccionamiento de la eliminación de glucosa por el cuerpo.

Figura 6. (A) Cinasas y fosfatases analizadas en esta invención mediante inmunotransferencia de tipo Western para evaluar su actividad y/o expresión. (C) Representación esquemática de la fosforilación de tau debido a la disfunción de la ruta Akt-GSK3, o la activación de cinasas adicionales tales como proteína cinasa A (PKA) o cinasa dependiente de ciclina (CDK5). En condiciones fisiológicas, Akt se fosforila y, por tanto, se activa. En una afección patológica, tal como resistencia a la insulina en el cerebro, Akt activa la cinasa GSK-3β, que a su vez fosforila tau. Esto puede producirse cuando otras cinasas (PKA, CDK5) están hiperactivadas. Cuando la proteína tau está hiperfosforilada, se disocia del microtúbulo y forma agregados insolubles denominados ovillos neurofibrilares (NFT) en neuronas y células gliales. Tanto la desestabilización del microtúbulo como la agregación de NFT conduce a la apoptosis celular. (B) Estructura química de D-pinitol (DPIN). DPIN es la forma 3-O-metilo de D-quirio-inositol (DCI) y se encuentra como ciclitol, un poliol cíclico. Es un conocido agente antidiabético aislado de la pulpa del fruto del algarrobo (*Ceratonia siliqua*). Cronograma esquemático de los diseños experimentales: se realizó la administración crónica por consumo en la bebida de DPIN y DCI en ratas Wistar en 20 ratas macho durante 10 días consecutivos. Se recogieron muestras de plasma y cerebro de ambos grupos experimentales. Abreviaturas: DPIN, D-pinitol; DCI, D-quirio-inositol.

Figura 7. Efecto de la administración oral de DPIN o DCI durante 10 días sobre la desfosforilación de tau en el hipocampo de ratas Wistar. A) Los diagramas de barras representan la razón entre la fosforilación de tau (AT8: Ser202, Thr205) y tau total, y la cantidad de tau total en comparación con α-adaptina en ratas Wistar. Los histogramas representan la media ± E.E.M. (n=8 para ratas Wistar). B) Membranas de inmunotransferencia de tipo Western después de cada incubación con anticuerpos (identificación de la proteína diana a la derecha de la banda). Los pesos moleculares (PM) se indican en kiloDalton (kD). Las inmunotransferencias muestran los resultados de cuatro de las ocho muestras independientes para los grupos de ratas Wistar. La expresión correspondiente de α-adaptina se muestra como control de carga por carril. Se realizaron ANOVA unifactorial y prueba de Tukey: (\*) P <0,05, (\*\*) P <0,01 y (\*\*\*) P <0,001 frente al grupo de vehículo.

Figura 8. Efecto de la administración oral de DPIN o DCI durante 10 días sobre la actividad de la tau cinasa, cinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) en el hipocampo de ratas Wistar. A) Los diagramas de barras representan la razón entre la cantidad de la tau cinasa p25, p35, y CDK5 total en comparación con α-adaptina en ratas Wistar. Los histogramas representan la media ± E.E.M. (n=8 para ratas Wistar). B) Membranas de inmunotransferencia de tipo Western después de cada incubación con anticuerpos (identificación de la proteína diana a la derecha de la banda). Los pesos moleculares (PM) se indican en kiloDalton (kD). Las inmunotransferencias muestran los resultados de tres de las ocho muestras independientes para el grupo de ratas Wistar. La expresión correspondiente de α-adaptina se muestra como control de carga por carril. Se realizó prueba de la t para datos independientes en el análisis de ratas Wistar (\*) P <0,05, (\*\*) P <0,01 y (\*\*\*) P <0,001 frente al grupo de vehículo.

Figura 9. Efecto de la administración oral de DPIN o DCI durante 10 días sobre la fosforilación de glucógeno sintasa cinasa-3β (GSK-3β) en el hipocampo de ratas Wistar. A) Los diagramas de barras representan la razón entre la fosforilación de GSK-3β (Ser9/Tyr216) y GSK3β total, y la cantidad de GSK-3β total en comparación con α-adaptina en ratas Wistar. B) Membranas de inmunotransferencia de tipo Western después de cada incubación con anticuerpos (identificación de la proteína diana a la derecha de la banda). Los pesos moleculares (PM) se indican en kiloDalton (kD). Las inmunotransferencias muestran los resultados de tres de las ocho muestras independientes para el grupo de ratas Wistar. La expresión correspondiente de α-adaptina se muestra como control de carga por carril. Se realizó prueba de la t para datos independientes en el análisis de ratas Wistar (\*) P <0,05, (\*\*) P <0,01 y (\*\*\*) P <0,001 frente al grupo de vehículo.

Figura 10. Efecto de la administración oral de DPIN o DCI durante 10 días sobre otras tau cinasas en el hipocampo: proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y proteína cinasa A (PKA) en el hipocampo de ratas Wistar. A) Los diagramas de barras representan la razón entre la cantidad de tau cinasas totales en comparación con α-adaptina en ratas Wistar. Los histogramas representan la media ± E.E.M. (n=8 para ratas Wistar). B) Membranas de inmunotransferencia de tipo Western después de cada incubación con anticuerpos (identificación de la proteína diana a la derecha de la banda). Los pesos moleculares (PM) se indican en kiloDalton (kD). Las inmunotransferencias muestran los resultados de tres de las ocho muestras independientes para el grupo de ratas Wistar. La expresión correspondiente de α-adaptina se muestra como control de carga por carril. Se realizó prueba de la t para datos independientes en el análisis de ratas Wistar (\*) P <0,05, (\*\*) P <0,01 y (\*\*\*) P <0,001 frente al grupo de vehículo.

### Descripción de la invención

La presente memoria descriptiva se refiere generalmente a un método para aumentar los niveles de grelina como resultado de la administración oral de D-pinitol, un poliol cíclico natural derivado de plantas incluyendo las vainas del algarrobo (figura 1). Podrían usarse otros estereoisómeros del inositol, que no forman parte de la presente invención, tales como D-quiro-inositol, cis-inositol, epi-inositol, alo-inositol, muco-inositol, neo-inositol, L-quiro-inositol, acilo-inositol, o cualquiera de las sales, los ésteres, los tautómeros, los solvatos y los hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos, o cualquiera de las combinaciones de los mismos. Tal como se muestra en los ejemplos incluidos a lo largo de la presente memoria descriptiva, la administración oral de D-pinitol (100 mg/kg (figura 2)) o la administración oral de 500 mg/kg de D-quiro-inositol (figura 3) potencia la secreción de gredina y reduce la insulina circulante, y activa adicionalmente la fosforilación de mTOR en el hipotálamo, un sensor metabólico necesario para aumentar el apetito (figura 3). El efecto neto es una reducción de la demanda de insulina, tal como se refleja por la disminución del índice de resistencia a la insulina HOMA (figuras 2 y 3), pero sin conducir a hipoglucemia o hiperglucemia. Esto es posible gracias al efecto directo de D-pinitol y D-quiroinisol sobre la absorción de glucosa por las células musculares junto con la producción neta de glucosa por el hígado gracias a la inhibición de piruvato cinasa que redirige la glicólisis hacia la producción de glucosa en el hígado (neoglucogénesis) (figura 2). La administración de D-quiro-inositol también potencia la secreción de gredina (figura 4).

Además, y tal como se propone en la figura 5, el uso de D-pinitol y D-quiro-inositol para fomentar la secreción de gredina armoniza la secreción de insulina y glucagón, reduciendo la demanda de insulina, y redirigiendo la producción de glucosa desde el hígado hasta su utilización por el músculo. Además, debido a las acciones conocidas de la gredina, se espera que el D-pinitol o inositoles relacionados, tales como D-quiro-inositol o su epímero mioinositol, aumenten la vitalidad y la masa muscular reduciendo la decrepitud muscular. Dado que las concentraciones de gredina disminuyen con la edad (16), estos compuestos ayudarán a fomentar un envejecimiento metabólico sano.

Por otro lado, los autores de la presente invención han hallado un papel para el D-pinitol en la prevención del deterioro cognitivo en el envejecimiento y en las taupatías. En este sentido, las propiedades de ahorro de insulina del D-pinitol y su capacidad para potenciar la secreción de gredina tienen un efecto procognitivo que puede usarse como estrategia preventiva para el deterioro cognitivo asociado a la neurodegeneración. La resistencia a la insulina en el cerebro está asociada al deterioro cognitivo, en especial modificando la función del hipocampo. Por otro lado, la gredina es una hormona singular capaz de potenciar la capacidad intelectual a través de su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y la interacción con el receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento. Por tanto, la nueva acción descrita en la presente invención podría explicar el uso de la administración de D-pinitol en el envejecimiento o en los trastornos neurodegenerativos, especialmente en la enfermedad de Alzheimer, para reducir el deterioro cognitivo en los estadios tempranos de la enfermedad, cuando los síntomas permiten el diagnóstico.

Sin embargo, estudios recientes han destacado la necesidad de centrarse en una diana molecular que sea el mejor factor asociado al inicio del deterioro cognitivo leve y al desarrollo de importantes demencias: la proteína tau. La fosforilación o acetilación anómala de tau genera deposición de proteína tau, provocando la aparición de ovillos neurofibrilares (NFT) como biomarcador histopatológico de un grupo de enfermedades conocidas colectivamente como taupatías. La formación de NFT está más fuertemente correlacionada con el deterioro cognitivo que la distribución de placa senil, que está formada por depósitos de proteína beta-amiloide (Ax) polimorfa, un sello distintivo patológico de una de las principales demencias, la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, la deposición de tau es el elemento crucial para el deterioro cognitivo observado en la enfermedad de Alzheimer (donde la deposición de β-amiloide es insuficiente para generar demencia, así como en la progresión hacia el deterioro cognitivo leve y la demencia observada en la encefalopatía traumática crónica).

Por tanto, la taupatía se ha considerado como un sello distintivo esencial en la neurodegeneración y el envejecimiento cerebral normal, y su prevención antes de la aparición de síntomas clínicos una necesidad médica descubierta. Teniendo en cuenta lo anterior, se examinaron los efectos de la administración de D-pinitol sobre el estado de fosforilación de Tau, un proceso complejo regulado por múltiples proteínas (figura 6) y sorprendentemente se halló que la administración oral de D-pinitol redujo notablemente la fosforilación de Tau (figura 7), a través de un mecanismo dependiente de la reducción de la actividad de la cinasa dependiente de ciclina 5 (figura 8), una de sus principales enzimas de fosforilación. Las acciones del D-pinitol fueron específicas, dado que no afectaron a otras proteínas reguladoras de tau (figura 9), proporcionando un perfil farmacológico singular para este inositol natural.

Basándose en los hallazgos anteriores, en la presente invención se propone además que la administración de D-pinitol deberá

a) prevenir o retardar el inicio del deterioro cognitivo leve y su progresión ulterior a demencia si una afección está fomentando la hiperfosforilación de tau y existe una intención de prevenir o retardar su aparición clínica. Estas afecciones incluyen enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de granos argirófilos, taupatías gliales globulares, taupatía primaria relacionada con la edad que incluye demencia con ovillos neurofibrilares, encefalopatía traumática crónica (ETC), y astrogliopatía tau relacionada con el

envejecimiento;

b) tratar taupatías diagnosticadas, incluyendo enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de grano argirófilo, taupatías gliales globulares, taupatía primaria relacionada con la edad que incluye demencia con ovillos neurofibrilares, encefalopatía traumática crónica (ETC), y astrogliopatía tau relacionada con el envejecimiento.

Por tanto, la presente divulgación se refiere generalmente al inositol D-pinitol (a continuación en el presente documento, compuesto de la presente invención) para aumentar los niveles de grelina. El compuesto de la presente invención se describe por la fórmula estructural identificada en figura 1 o por cualquier sal farmacéuticamente aceptable derivada a partir del mismo. Además, la presente invención se refiere además al compuesto de la presente invención para reducir la fosforilación de Tau y, por tanto, prevenir o ralentizar la progresión de las manifestaciones clínicas de una taupatía en un sujeto, preferiblemente en un sujeto antes de la aparición de tales manifestaciones clínicas, más preferiblemente en un sujeto humano, en donde la taupatía se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de grano argirófilo, taupatías gliales globulares, taupatía primaria relacionada con la edad que incluye demencia con ovillos neurofibrilares, encefalopatía traumática crónica (ETC), y astrogliopatía tau relacionada con el envejecimiento.

En la presente invención, el término "sujeto asintomático" se entiende como un sujeto que no muestra la manifestación clínica de la enfermedad, en particular de una taupatía.

En la presente invención, el término "inicio de la manifestación clínica de una taupatía" se entiende como la aparición de síntomas y signos cognitivos, neuropsicológicos y/o neurológicos, incluyendo procedimientos de diagnóstico objetivo (es decir, obtención de imágenes por resonancia magnética, tomografía por emisión de positrones y biomarcadores del líquido cefalorraquídeo), que indica el diagnóstico de una taupatía.

En la presente invención, el término "el inicio de las manifestaciones clínicas del deterioro cognitivo leve" (DCL) se entiende como la etapa entre el deterioro cognitivo esperado del envejecimiento normal y el deterioro más grave de la demencia. Se caracteriza por problemas con la memoria, el lenguaje, el pensamiento o el juicio.

En la presente invención, el término "prevención" significa evitar la aparición de la enfermedad o afección patológica en un individuo, particularmente cuando el individuo tiene predisposición para la afección patológica pero aún no se le ha diagnosticado. En la presente invención, la enfermedad o afección patológica es preferiblemente una "taupatía".

En la presente invención, el término "taupatía" pertenece a una clase de enfermedades neurodegenerativas que implican la agregación de la proteína tau en ovillos neurofibrilares o gliofibrilares (NFT) en el cerebro humano. Los ovillos se forman por hiperfosforilación de la proteína de los microtúbulos conocida como tau, haciendo que la proteína se disocie de los microtúbulos y forme agregados insolubles. (Estas agregaciones también se denominan filamentos helicoidales emparejados). Los ejemplos de taupatías se seleccionan de la lista que consiste en enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de grano argirófilo, taupatías gliales globulares, taupatía primaria relacionada con la edad que incluye demencia con ovillos neurofibrilares, encefalopatía traumática crónica (ETC), y astrogliopatía tau relacionada con el envejecimiento.

Tal como ya se ha indicado, el compuesto de la presente invención es útil para reducir notablemente la fosforilación de Tau y, por tanto, prevenir o ralentizar el inicio o la progresión de las manifestaciones clínicas de una taupatía en un sujeto, preferiblemente en un sujeto antes o después de la aparición de tales manifestaciones clínicas. Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método para prevenir o ralentizar el inicio o la progresión de las manifestaciones clínicas de una taupatía en un sujeto. Más preferiblemente, la presente invención proporciona un método para prevenir o ralentizar el inicio de las manifestaciones clínicas de una taupatía en un sujeto, es decir, un método para prevenir o ralentizar la aparición de tales manifestaciones clínicas en dicho sujeto, preferiblemente en un sujeto sano.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de D-pinitol o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento útil para prevenir o ralentizar la progresión de las manifestaciones clínicas de una taupatía en un sujeto, es decir, para prevenir o ralentizar la aparición de tales manifestaciones clínicas en dicho sujeto, preferiblemente en un sujeto sano.

Además de lo que se ha descrito anteriormente, la presente invención también abarca la posibilidad de que una composición de la presente invención esté en forma de suplemento dietético o composición nutricional que comprende D-pinitol o cualquier sal del mismo. En este sentido, en el caso de que la composición de la invención se formule como una composición nutricional, dicha composición nutricional puede ser un alimento o incorporarse en un alimento o producto alimenticio destinado al consumo tanto humano como animal. Por tanto, en una realización particular, la composición nutricional se selecciona de entre un alimento (que puede ser un alimento con propósitos nutricionales específicos o un alimento medicinal) y un suplemento nutricional.

En la presente invención, el término "composición nutricional" se refiere a ese alimento que, independientemente de proporcionar nutrientes al sujeto que lo consume, afecta beneficiosamente a una o más funciones del cuerpo, para proporcionar mejor salud y bienestar.

5 El término "suplemento", sinónimo de cualquiera de los términos "suplemento dietético", "suplemento nutricional", "suplemento alimenticio", o "suplemento alimentario" o "complemento alimentario", se refiere a productos o preparaciones cuyo propósito es suplementar la dieta normal que consiste en fuentes de nutrientes concentrados u otras sustancias con un efecto nutricional o fisiológico. En la presente invención, la "sustancia" que tiene un efecto nutricional o fisiológico sobre el individuo cuando se ingiere el complemento alimentario es el D-pinitol o cualquier sal del mismo, que forma parte de cualquiera de las composiciones de la presente invención. El suplemento alimenticio puede estar en forma individual o combinada y comercializarse en forma de dosificación, es decir, en cápsulas, píldoras, comprimidos y otras formas similares, sobres de polvo, ampollas de líquidos y frascos dispensadores de gotas y otras formas similares de líquidos y polvos diseñadas para tomarse en una única cantidad. El suplemento alimenticio puede ser cualquier suplemento de origen vegetal que contenga D-pinitol, incluyendo jarabes de fruto del algarrobo.

10 Preferiblemente, dichas composiciones nutricionales o dichos suplementos dietéticos están destinados o se usan para prevenir o ralentizar la progresión de las manifestaciones clínicas de una taupatía en un sujeto, preferiblemente en un sujeto antes de o previamente a la aparición de tales manifestaciones clínicas, más preferiblemente en un sujeto sano.

15 Existe una amplia gama de nutrientes y otros elementos que pueden estar presentes en los complementos alimentarios, incluyendo, entre otros, vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos grasos esenciales, fibra, enzimas, plantas y extractos vegetales. Dado que su papel es complementar el suministro de nutrientes en una dieta, no deben usarse como sustituto de una dieta equilibrada y la ingesta no debe superar la dosis diaria expresamente recomendada por el médico o nutricionista.

20 Los ejemplos de alimentos que pueden comprender las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitarse a, pienso, productos lácteos, productos vegetales, productos cárnicos, aperitivos, chocolates, bebidas, alimentos infantiles, cereales, alimentos fritos, productos de panadería industrial y galletas. Los ejemplos de productos lácteos incluyen, pero no se limitan a, productos derivados de leche fermentada (por ejemplo, pero sin limitarse a, yogur o queso) o leche no fermentada (por ejemplo, pero sin limitarse a, helado, mantequilla, margarina o lactosuero). El producto vegetal es, por ejemplo, pero sin limitarse a, un cereal en cualquier forma de presentación, fermentado (por ejemplo, yogur de soja, yogur de avena, etc.) o no fermentado, y un aperitivo. La bebida puede ser, pero no se limita a, leche no fermentada. En una realización particular, el producto alimenticio o alimento se selecciona del grupo que consiste en zumos de frutas o verduras, helado, leche maternizada, leche, yogur, queso, leche fermentada, leche en polvo, productos liofilizados o secados al aire (adecuados para su reconstitución con un vehículo líquido), cereales, productos horneados, productos a base de leche, productos cárnicos y bebidas.

25 40 El D-pinitol o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo o compuestos de éster pueden proporcionarse en un kit. Un kit de este tipo contiene normalmente un compuesto activo de D-pinitol en formas de dosificación para su administración. Una forma de dosificación contiene una cantidad suficiente de compuesto activo de manera que puede obtenerse un efecto beneficioso cuando se administra a un sujeto durante intervalos regulares, tal como 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 veces al día, durante el transcurso de 1 o más días. Preferiblemente, un kit contiene instrucciones que indican el uso de la forma de dosificación y la cantidad de forma de dosificación que va a tomarse a lo largo de un periodo de tiempo especificado.

30 45 50 El término "sujeto" significa un mamífero. Una realización del término "mamífero" es un "humano", siendo dicho humano hombre o mujer. Como tal, el término "mamífero" incluye animales de compañía tales como gatos y perros. El término "mamífero que lo necesita" se refiere a un mamífero que necesita tratamiento o profilaxis según lo determina un investigador, veterinario, médico u otro profesional clínico.

55 60 Se pretende que el término "composición", como en composición farmacéutica, abarque un producto que comprende el/los principio(s) activo(s) y el/los principio(s) inerte(s) que constituye(n) el portador, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de dos o más principios cualesquiera, o de la disociación de uno o más de los principios, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los principios. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualquier composición preparada mezclando un compuesto de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. También se pretende que el término "composición" abarque composiciones nutracéuticas o alimenticias. Un nutracéutico es un alimento o producto alimenticio que proporciona beneficios para la salud y médicos, incluyendo la prevención y el tratamiento de dolencias humanas.

65 Se entenderá que los compuestos de la presente invención incluyen hidratos, solvatos, polimorfos, formas cristalinas, cristalinas hidratadas y amorfas de los compuestos de la presente invención, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de

5 bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases inorgánicas u orgánicas y ácidos inorgánicos u orgánicos. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, de amonio, de calcio, de cobre, férricas, ferrosas, de litio, de magnesio, mangánicas, manganosas, de potasio, de sodio, de zinc, y similares. Se prefieren particularmente las sales de amonio, calcio, litio, magnesio, potasio, y sodio. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas, y resinas de intercambio iónico básicas, tales como arginina, betaina, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripripilamina, trometamina, y similares. Cuando el compuesto de la presente invención es básico, pueden prepararse sales a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos y orgánicos. Tales ácidos incluyen los ácidos acético, bencenosulfónico, benzoico, alcanforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fórmico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, malónico, mágico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, propiónico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico, trifluoroacético, y similares. Se prefieren particularmente los ácidos cítrico, fumárico, bromhídrico, clorhídrico, maleico, fosfórico, sulfúrico, y tartárico.

10 Preferiblemente, y tal como ya se ha indicado a lo largo de la presente memoria descriptiva, se entenderá que, tal como se usa en el presente documento, también se pretende que las referencias a los compuestos de D-pinitol incluyan las sales farmacéuticamente aceptables, tales como las sales de clorhidrato. El compuesto de la presente invención es útil en el tratamiento, el control o la prevención de enfermedades, trastornos o afecciones caracterizados por una secreción de grelina alterada que da como resultado niveles de grelina activa en circulación sanguínea inferiores a los niveles de referencia preprandiales normales de grelina activa en circulación sanguínea.

15 20 25 Debe entenderse que los términos "administración de" y o "administrar" un compuesto significan proporcionar un compuesto de la invención a un sujeto que necesita tratamiento. La administración de los compuestos de la presente invención con el fin de poner en práctica los presentes métodos de terapia se lleva a cabo administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto a un sujeto que necesita tal tratamiento o profilaxis. La necesidad de una administración profiláctica según los métodos de la presente invención se determina mediante el uso de factores de riesgo bien conocidos.

30 35 40 45 El término "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, significa la cantidad del compuesto activo que provocará la respuesta biológica o médica en un tejido, sistema, sujeto, mamífero o humano que está buscando el investigador, veterinario, médico u otro profesional clínico, que incluye el alivio de los síntomas del trastorno que está tratándose. Los nuevos métodos de tratamiento de esta invención son para trastornos conocidos por los expertos en la técnica. El término "cantidad profilácticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, significa la cantidad del compuesto activo que provocará la respuesta biológica o médica en un tejido, sistema, sujeto, mamífero o humano que está buscando el investigador, veterinario, médico u otro profesional clínico, para prevenir el inicio del trastorno en sujetos que tienen el riesgo de padecer obesidad o el trastorno. La cantidad o dosificación terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto individual se determina, en el análisis final, por el médico encargado del caso, pero depende de factores tales como la enfermedad exacta que va a tratarse, la gravedad de la enfermedad y otras enfermedades o afecciones que padece el paciente, la vía de administración elegida, otros fármacos y tratamientos que puede requerir el paciente de manera concomitante, y otros factores según el criterio del médico.

50 55 Administración e intervalos de dosis. Puede emplearse cualquier vía de administración adecuada para proporcionar a un sujeto o mamífero, especialmente a un humano, una dosificación eficaz de un compuesto de la presente invención. Por ejemplo, pueden emplearse las vías oral, rectal, tópica, parenteral, ocular, pulmonar, nasal, y similares. Las formas de dosificación incluyen comprimidos, trociscos, dispersiones, suspensiones, disoluciones, cápsulas, cremas, pomadas, aerosoles, y similares. Preferiblemente, los compuestos de la invención se administran por vía oral. La dosificación eficaz del principio activo empleado puede variar dependiendo del compuesto particular empleado, del modo de administración, de la afección que está tratándose, y de la gravedad de la afección que está tratándose. Tal dosificación puede determinarla fácilmente un experto en la técnica.

60 65 La magnitud de la dosificación profiláctica o terapéutica de los compuestos de la presente invención variará, por supuesto, dependiendo del compuesto particular empleado, del modo de administración, de la afección que está tratándose, y de la gravedad de la afección que está tratándose. También variará según la edad, el peso y la respuesta del paciente individual. Tal dosificación puede determinarla fácilmente un experto en la técnica.

Tal como ya se ha indicado, los compuestos de la invención pueden usarse en combinación con otros fármacos que se usan en el tratamiento/prevención/supresión o la mejora de las enfermedades o afecciones para las que es útil el compuesto de la invención. Tales otros fármacos pueden administrarse, por una vía y en una cantidad comúnmente usada para la misma, de manera simultánea o secuencial con un compuesto de la invención. Cuando un compuesto de la invención se usa simultáneamente con uno o más de otros fármacos, se prefiere una composición farmacéutica que contenga dichos otros fármacos además del compuesto de la invención.

Las composiciones de la presente invención incluyen composiciones adecuadas para administración oral, rectal, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, e intravenosa), ocular (oftálmica), pulmonar (inhalación nasal o bucal), o nasal, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y de la gravedad de las afecciones que van a tratarse y de la naturaleza del principio activo. Pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. En el uso práctico, los compuestos de la invención pueden combinarse como principio activo en mezcla íntima con un portador farmacéutico según técnicas de elaboración de composiciones farmacéuticas convencionales. El portador puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para su administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluyendo intravenosa). En la preparación de las composiciones para la forma de dosificación oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes, y similares en el caso de preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y disoluciones; o portadores tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desgregantes, y similares en el caso de preparaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas duras y blandas y comprimidos, prefiriéndose las preparaciones orales sólidas frente a las preparaciones líquidas.

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral típica, en cuyo caso se emplean normalmente portadores farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas acuosas o no acuosas convencionales. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0,1 por ciento de compuesto activo. Por supuesto, puede variarse el porcentaje de compuesto activo en estas composiciones y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 2 por ciento y aproximadamente el 60 por ciento del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación eficaz. Los compuestos activos también pueden administrarse por vía intranasal como, por ejemplo, pulverizaciones o gotas líquidas. Los comprimidos, las píldoras, las cápsulas, y similares también pueden contener un aglutinante tal como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente desgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando una forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido tal como un aceite graso. Pueden estar presentes diversos otros materiales como recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos pueden recubrirse con goma laca, azúcar, o ambos. Un jarabe o elixir puede contener, además del principio activo, sacarosa como agente edulcorante, metilparabenos y propilparabenos como conservantes, un colorante, y un aromatizante tal como aroma de cereza o naranja.

Los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía parenteral. Pueden prepararse disoluciones o suspensiones de estos compuestos activos en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Finalmente, los compuestos de la invención también pueden administrarse como composiciones nutracéuticas o alimenticias tales como bebidas.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida de que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención, pero no limitan a la misma.

### Ejemplos

Sólo los ejemplos referentes al D-pinitol reivindicado en el presente documento forman parte de la presente invención. Los ejemplos referentes a otros inositoles, es decir, D-ribo-inositol, son ejemplos de referencia.

#### Ejemplo 1.

#### METODOLOGIA DEL EJEMPLO 1

Animales y declaración de ética.

Se llevaron a cabo procedimientos experimentales con animales en acuerdo estricto con las recomendaciones de la directiva 2010/63/EU de las Comunidades Europeas y la legislación española (Real Decreto 53/2013, BOE 34/11370-11421, 2013) que regulan el cuidado y uso de animales de laboratorio. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética para Experimentos con Animales de la Universidad de Málaga. Todos los estudios que implicaban animales se notificaron según las directrices ARRIVE para notificar experimentos que implican animales (Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M. y Altman, D. G. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. PLoS Biol 8, e1000412, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412> (2010)). Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y para reducir el número de animales usados. Los experimentos se realizaron en ratas Wistar macho de 4 a 5 semanas de edad (Crl:WI; Charles River Laboratories, Barcelona, España). Los animales se sometieron a un ciclo de luz-oscuridad de 12 h convencional en una sala con control de temperatura y humedad. Todas las ratas fueron provistas de agua y dieta granulada convencional (ETS) para ratas disponible comercialmente (3,02 kcal/g con el 30 % de kcal de proteína, el 55 % de kcal de hidratos de carbono y el 15 % de kcal de grasa) a voluntad.

15 *Preparación del fármaco y dosis administrada.*

El D-pinitol (3-O-metil-D-quiro-inositol) fue generosamente proporcionado por EURONUTRA SL (<https://www.euronutra.com/>, Málaga, España), en forma de polvo fino cristalino (lote: PPN-M0201). Para tratamientos de dosis única, se disolvió D-pinitol en agua para administrarse por sonda nasogástrica (por vía oral) a diferentes concentraciones (100 mg/kg y 500 mg/kg), se administró el fármaco a un volumen de 1 ml/kg.

20 *Pautas de tratamiento.*

25 Después de 18 horas de ayuno, se administró D-pinitol disuelto en agua en dosis única por sonda nasogástrica (100 mg/kg en un primer estudio, y 500 mg/kg en un estudio posterior). Después de la administración, se sacrificaron los animales en grupos en diferentes momentos (siendo el tiempo 0 la administración de D-pinitol). Para el primer estudio (100 mg/kg), se sacrificaron grupos de animales a los tiempos: 10, 20, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos después de la administración; para el segundo estudio (500 mg/kg), se sacrificaron los animales a los tiempos: 60, 120 y 240 minutos después de la administración. Como grupo de control, a un grupo se le administró sólo agua (por sonda nasogástrica).

30 *Recogida de muestras.*

35 Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), y se recogieron muestras de sangre, cerebro e hígado. La sangre se centrifugó (2100 g durante 8 min, 4 °C) y el plasma se mantuvo para su análisis adicional. Las muestras de hígado y cerebro se ultracongelaron en N<sub>2</sub> líquido, después se almacenaron a -80 °C hasta su análisis adicional.

40 *Medición de metabolitos en plasma.*

45 Los niveles de insulina y grelina en plasma se determinaron con un método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando kits comerciales: n.<sup>º</sup> de cat. EZRMI-13K y n.<sup>º</sup> de cat. EZRGRT-91K de EMD Millipore Corporation (Billerica, MA, EE. UU.), respectivamente. Los niveles de glucagón en plasma se determinaron con un kit de inmunoensayo enzimático (EIA) de glucagón: n.<sup>º</sup> de cat. RAB0202 de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.). Todas las muestras de suero se sometieron a ensayo por duplicado en un ensayo, y los resultados se expresaron en cuanto a la hormona patrón particular.

50 *Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc.*

55 Se extrajo el ARN total de porciones de tejido de hígado (100-300 mg) usando el método de Trizol® según las instrucciones del fabricante (GIBCO BRL Life Technologies). Para garantizar la pureza de las secuencias de ARNm, se aislaron muestras de ARN con un kit de limpieza RNeasy Minelute (Qiagen), que incluía digestión con columna de ADNasa I (conjunto de ADNasa libre de ARNasa, Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el ARN total usando un espectrofotómetro (espectrofotómetro Nanodrop 1000, Thermo Scientific) para garantizar razones A260/280 de 1,8 a 2,0. La transcripción inversa se llevó a cabo a partir de 1 µg de ARN usando el kit de transcripción inversa Transcriptor y cebadores hexámeros aleatorios (Transcriptor RT, Roche Diagnostic GmbH). Los controles negativos incluían reacciones de transcripción inversa que omitieron la transcriptasa inversa.

60 *Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real y análisis de expresión génica.*

65 La qPCR en tiempo real se realizó siguiendo los criterios de las directrices MIQE (Bustin, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 55, 611-622 (2009)). Las reacciones en cadena de la polimerasa se llevaron a cabo en el sistema de detección por PCR en tiempo real CFX96 Touch™ (Bio-Rad, Hercules, CA) para cada molde de ADNc, y se amplificaron en un volumen de reacción de 20 µl que contenía 9 µl de ADNc (diluido 1/100) y 11 µl de mezcla maestra que contenía el cebador

(TaqMan, Life Technologies). El gen de rata diana fue piruvato cinasa hepática/RBC (Pkrl) (tabla suplementaria). El cebador se obtuvo basándose en los ensayos de expresión génica TaqMan® y el formato de etiqueta de colorante FAM™ (Life Technologies). Cada reacción se realizó por duplicado. Los parámetros de ciclado fueron 50 °C durante 2 min para desactivar el ADN monocatenario y bicatenario que contenía dUTP, 95 °C durante 10 min para activar la ADN polimerasa Taq, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s para la fusión del ADNc, y 60 °C durante 1 minuto para permitir la hibridación y la extensión de los cebadores, durante lo cual se adquirió la fluorescencia. Los datos de fluorescencia sin procesar se sometieron a la herramienta Miner en línea (<http://www.miner.ewindopp.info/>) para el cálculo de los valores de Cq y eficiencia para cada conjunto experimental (Zhao, S. y Farnald, R. D. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J Comput Biol.* 12, 1047-1064 (2005)). Los valores de Cq se convirtieron en valores de expresión relativa teniendo en cuenta las eficiencias de amplificación, las variaciones entre ejecuciones, y los factores de normalización por medio del software qbasePLUS de Biogazelle (Biogazelle, Zwijnaarde, Bélgica) usando al menos dos genes de rata de referencia: beta-actina (Actb) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh) (tabla suplementaria). Para todos los estudios de genes diana y de referencia, se evaluaron dos muestras biológicas independientes de cada condición experimental por duplicados técnicos. La repetitividad entre réplicas fue aceptada cuando el valor de ΔCq fue ≤ 0.7. Finalmente, los valores de cantidad relativa normalizada calibrada (CNRQ) se exportaron desde el software qbasePLUS y se investigaron estadísticamente.

Tabla 1. Referencias de cebadores para los ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems).

Descripción de gen	ID de ensayo	N.º de registro de GenBank	Longitud de amplicón
<b>Genes diana</b>			
Pkrl	Rn01455286_m1	NC_005101.4	58
<b>Genes de referencia</b>			
Gapdh	Rn01775763_g1	NC_005103.4	174
Actb	Rn00667869_m1	NM_031144.2	91

*Extracción de proteínas y análisis por inmunotransferencia de tipo Western.*

Extracto de cerebro. Se homogeneizaron muestras de cerebro congeladas (17 mg por muestra) en 1 ml de tampón de lisis RIPA frío (HCl de Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NaDOC al 0,5 %, EDTA 1 mM, Triton al 1 %, SDS al 0,1 %, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM) suplementado con un cóctel de proteasas (Roche). La suspensión se incubó durante 2 horas a 4 °C, seguido de centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de centrífuga limpio nuevo, y se usó el método colorimétrico de Bradford para determinar la concentración de la proteína total. Los extractos de proteína se diluyeron 1:1 en tampón de carga (DTT 2X) y se calentaron durante 5 minutos a 99 °C antes de someterse a electroforesis.

Análisis por inmunotransferencia de tipo Western. La expresión de la proteína incluyendo mTOR (289 kDa) y adaptina (100 kDa) se analizó mediante inmunotransferencia de tipo Western. La proteína tisular (10-15 µg) se sometió a electroforesis en geles de Bis-Tris Criterion XT Precast al 4-12 % (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) durante 30 minutos a 80 V y 2 h a 150 V. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) durante 1 h a 80 V mediante un equipo de transferencia en húmedo. La membrana se lavó dos veces durante 5 min en TBST (HCl de Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1 %, pH 7,6) y se bloqueó con BSA-TBST al 5 % durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma de agitación. Posteriormente, la membrana se incubó con los respectivos anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C diluidos en BSA-TBST al 2 %. Los anticuerpos contra p-mTOR (Ser2448) y m-TOR se adquirieron de Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, Estados Unidos); la α-adaptina de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces durante 5 min con TBST. Un anticuerpo secundario de conejo/ratón conjugado con HRP apropiado (Promega, Madison, WI, EE. UU.) se diluyó 1:10000 en BSA-TST al 2 % y se incubó con la membrana durante 1 h de agitación a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se lavó tal como antes y se expuso a reactivo quimioluminiscente (Santa Cruz, Biotechnology Inc., CA, EE. UU.) durante 5 min. La respectiva proteína unida a la membrana se visualizó entonces mediante quimioluminiscencia (sistema de obtención de imágenes ChemiDoc, Bio-Rad). Las bandas se cuantificaron mediante análisis densitométrico usando el software ImageJ (Rasband, WS, ImageJ, Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos, Bethesda, MD, EE. UU.).

Todos los datos se expresan como media ± EEM. Se realizaron análisis estadísticos en GraphPad Prism, versión 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Se evaluó el análisis de la varianza (ANOVA) unifactorial, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey cuando fuera apropiado. Los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron significativos.

55 Resultados del ejemplo 1

1.1. Resultados de la administración oral de pinitol (100 mg/kg) disuelto en agua estéril a ratas Wistar macho adultas

5 Tal como se muestra en figura 2, la administración oral de pinitol (100 mg/kg) disuelto en agua estéril a ratas Wistar macho adultas da como resultado a) un aumento de la concentración de grelina en plasma circulante que está asociado con B) liberación disminuida de insulina a la circulación sanguínea, C) reducción de la resistencia a la insulina medida mediante el índice HOMA, y D) inhibición de la expresión de piruvato cinasa, una enzima clave para desviar fosfoenolpiruvato a la producción de glucosa.

10 10 Además, tal como se muestra en figura 3, la administración oral de pinitol (500 mg/kg) a ratas Wistar macho adultas da como resultado A) un aumento de la concentración de grelina en plasma circulante que está asociado con B) liberación disminuida de insulina a la circulación sanguínea, C) mantenimiento de los niveles de glucosa en plasma, D) reducción de la resistencia a la insulina medida mediante el índice HOMA, E) aumento de la secreción de glucagón y F) activación de la señalización hipotalámica de mTOR en el hipotálamo a través de su fosforilación.

15 15 1.2. Resultados de la administración oral de D-quirositol (500 mg/kg) disuelto en agua estéril a ratas Wistar macho adultas

Tal como se muestra en figura 4, la administración oral de D-quirositol (500 mg/kg) potencia la secreción de gredina tal como se mide a través de la monitorización de concentraciones de gredina en plasma circulante.

20 20 1.3. Modelo de acción propuesto de los inositoles en el envejecimiento metabólico

O bien D-pinitol o bien D-quirositol potencia la secreción de gredina y fomenta una situación metabólica caracterizada por una demanda reducida de insulina desde el páncreas endocrino, neoglucogénesis en el hígado, uso muscular potenciado de glucosa con crecimiento muscular asociado, y señalización de mTOR potenciada en el hipotálamo que conduce a un aumento del apetito. Las consecuencias generales de este singular perfil farmacológico pueden incluir la protección del páncreas frente al agotamiento derivado de la obesidad y la resistencia a la insulina asociada con la edad, vitalidad muscular potenciada (que previene la sarcopenia y la decrepitud características de los ancianos) y un mejor direccionamiento de la eliminación de glucosa por el cuerpo.

### 30 30 Ejemplo 2

#### METODOLOGÍA

##### Animales y declaración de ética

35 35 Se llevaron a cabo procedimientos experimentales con animales según la directiva 2010/63/EU de las Comunidades Europeas y la legislación española (Real Decreto 53/2013). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética para Experimentos con Animales de la Universidad de Málaga, España. Según las directrices ARRIVE, se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales usados por grupo experimental. Se realizaron experimentos de consumo crónico en la bebida en ratas Wistar en 20 ratas macho. Todas las ratas adultas, de 2 meses de edad (~300 g de peso corporal), fueron proporcionadas por Charles River Laboratories (Barcelona, España). Los animales se alojaron individualmente en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h convencional en una sala con control de temperatura y humedad. Se proporcionaron agua y gránulos de pienso para ratas a voluntad a lo largo del transcurso del presente estudio.

40 40 45 Preparación y administración de inositoles

50 50 55 Caromax®-D-pinitol (3-O-metil-d-quirositol, DPIN, 98 % de pureza) y Caromax®-D-quirositol (cis-1,2,3-trans-3,5,6-ciclohexanohexol, DCI) fueron proporcionados por Euronutriña SL (Málaga, España). Se disolvieron en agua para su administración diaria por vía oral mediante consumo en la bebida y/o sonda nasogástrica a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal (PC) en un volumen de 1 ml/kg de PC a ratas Zucker y Wistar durante 4 semanas (28 días) y 10 días, respectivamente (figura 1). Durante los tratamientos de consumo en la bebida, la concentración de inositoles en el agua se actualizó considerando el aumento diario de PC de las ratas y la posible pérdida de agua por evaporación.

60 60 65 Extracción de proteínas y análisis por inmunotransferencia tipo Western.

- Extracto de cerebro. Se homogeneizaron muestras de cerebro congeladas (17 mg por muestra) en 1 ml de tampón de lisis RIPA frío (HCl de Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NaDOC al 0,5 %, EDTA 1 mM, Triton al 1 %, SDS al 0,1 %, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM) suplementado con un cóctel de proteasas (Hoffmann-Roche). La suspensión se incubó durante 2 horas a 4 °C, seguido de centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de centrifuga limpio nuevo, y se usó el método colorimétrico de Bradford para determinar la concentración de la proteína total. Los extractos de proteína se diluyeron 1:1 en tampón de carga (DTT 2X) y se calentaron durante 5 minutos a 99 °C antes de someterse a electroforesis.

- Análisis por inmunotransferencia tipo Western. La proteína tisular (10-15 µg) se sometió a electroforesis en

geles de Bis-Tris Criterion XT Precast al 4-12 % (Bio-Rad, EE. UU.) durante 30 minutos a 80 V y 2 h a 150 V. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (Bio-Rad, EE. UU.) durante 1 h a 80 V mediante un equipo de transferencia en húmedo. La membrana se lavó dos veces durante 5 min en TBST (HCl de Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1 %, pH 7,6) y se bloqueó con albúmina sérica bovina-solución salina tamponada con Tris (BSA-TBST) al 2 % durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma de agitación. 5 Posteriormente, la membrana se incubó con los respectivos anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C diluidos en BSA-TBST al 2 % (tabla 2 para información adicional). Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces durante 10 5 min con TBST. Un anticuerpo secundario de conejo/ratón conjugado con HRP apropiado (Promega) se diluyó 1:10000 en BSA-TST al 2 % y se incubó con la membrana durante 1 h de agitación a temperatura ambiente. Finalmente, 15 la membrana se lavó tal como antes y se expuso a reactivo quimioluminiscente (Santa Cruz, Biotechnology Inc.) durante 5 min. Se usaron etapas de separación/reprobación cuando fue necesario. La respectiva proteína unida a la membrana se visualizó entonces mediante quimioluminiscencia (sistema de obtención de imágenes ChemiDoc, Bio-Rad). Las bandas se cuantificaron mediante análisis densitométrico usando el software ImageJ (Rasband, WS, ImageJ, Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos, Bethesda, MD, EE. UU.). La normalización se realizó usando una proteína de referencia de la misma membrana, la α-adaptina. Los resultados se expresaron como la razón proteína/α-adaptina o la razón proteína fosforilada/total y se normalizaron con respecto al grupo de control (el eje Y representa la "media en veces de los valores de control").

#### Análisis de datos y estadística

Todos los datos se expresan como media ± EEM. Se realizó un análisis estadístico para estudios en los que cada tamaño de grupo era de, al menos, n = 5. El análisis estadístico se realizó en GraphPad Prism, versión 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Se evaluó el análisis de la varianza (ANOVA) unifactorial y bifactorial, 20 seguido de la prueba de comparaciones múltiples *a posteriori* de Tukey. Las pruebas *a posteriori* se realizaron 25 solamente si F en ANOVA alcanzó un valor de P inferior a 0,05 y no había ninguna falta de homogeneidad estadísticamente significativa de la varianza. El análisis de dos grupos individuales se realizó usando la prueba de la t de Student para datos independientes. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a P<0,05.

30 Tabla 2. Anticuerpos primarios usados para la expresión de proteínas mediante inmunotransferencia de tipo Western.

ANTÍGENO	DETALLES DE FABRICACIÓN	DILUCIÓN
FOSFO-TAU (SER202, THR205) [AT8]	Thermo Fisher Scientific (#MN1020)	1:1000
TAU [TAU46]	Abcam (#ab203179)	1:1000
ALFA 1-ADAPTINA [ERP7572]	Abcam (ab151720)	1:2000
FOSFO-GSK-3 ALFA/BETA (TYR279/TYR216)	Merck Millipore (#15648)	1:1000
FOSFO-GSK-3 BETA (SER9) [D85E12]	Cell Signaling Technology (#5558)	1:1000
GSK-3 BETA [D5C5Z]	Cell Signaling Technology (#12456)	1:1000
AMPK-ALFA [D63G4]	Cell Signaling Technology (#5832)	1:1000
FOSFO-AMPK-ALFA (THR172) [40H9]	Cell Signaling Technology (#2535)	1:1000
FOSFO-PKA ALFA (THR198)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (#sc-32968)	1:200
PKA ALFA CAT (C-20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (#sc-903)	1:200
FOSFO-P44/42 MAPK (ERK1/2) (THR202/TYR204)	Cell Signaling Technology (#9101)	1:1000
P44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling Technology (#4695)	1:1000
CDK5 (1H3)	Cell Signaling Technology (#12134)	1:1000
P35/25 (C64B10)	Cell Signaling Technology (#2680)	1:1000

5 Abreviaturas: GSK-3 $\beta$ , glucógeno sintasa cinasa 3 beta; AMPK- $\alpha$ , proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina alfa; PTEN, homólogo de fosfatasa y tensina; unidad C de PP2A, unidad catalítica de proteína fosfatasa 2A; PKA $\alpha$  cat, subunidad catalítica de proteína cinasa dependiente de cAMP alfa; PP2C, proteína fosfatasa 2C; MAPK, proteína cinasa activada por mitógenos; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; COX-2, ciclooxygenasa 2; Iba1, molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1.

## RESULTADOS

10 2.1. Efecto de D-pinitol o D-quiro-inositol administrado de manera prolongada durante 10 días sobre el estado de fosforilación de la proteína tau en el hipocampo de ratas Wistar.

15 Se trataron ratas Wistar por vía oral mediante consumo en la bebida de DPIN y DCI durante 10 días (figura 6). En este caso, se analizaron la expresión y la fosforilación de la proteína tau, un sello distintivo de trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer. Para ello, se usaron dos anticuerpos específicos: anticuerpo contra fosfo-tau (AT8) que reconoce la proteína tau fosforilada en serina 202 y treonina 205. El anticuerpo contra tau total (Tau46) reconoce tanto la isoforma fosforilada como la isoforma no fosforilada. La administración prolongada de DPIN y DCI tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la desfosforilación de la proteína tau. La cantidad de fosfo-tau después de ambos compuestos ha disminuido hasta más de la mitad en comparación con el grupo de vehículo (ANOVA unifactorial:  $F_{(2,23)} = 49,97$ , valor de  $P < 0,0001$ ; prueba de Tukey: valor de  $P < 0,0001$ , figura 7A.1).

20 A continuación se cuantificó cuánta proteína tau total había en las mismas muestras, con el fin de evaluar si esa disminución de fosfo-tau se debía o no a una menor cantidad de tau total. Se hallaron diferencias estadísticas significativas en los niveles relativos de proteína de tau total después del tratamiento con DPIN y DCI (ANOVA unifactorial:  $F_{(2,23)} = 11,72$ , valor de  $P = 0,0003$ ; prueba de Tukey: valor de  $P < 0,01$ , figura 7A.2) que reflejan un aumento en comparación con el grupo de vehículo. Por tanto, la administración prolongada de DPIN y DCI en ratas Wistar durante 10 días no sólo produjo una reducción significativa de fosfo-tau, sino también un aumento de la cantidad de proteína total.

25 30 2.2. Inhibición de cinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) después de la administración de DPIN como supuesta explicación de la desfosforilación de tau en el hipocampo.

35 Se cree que la cinasa dependiente de ciclina 5 (cdk5) está implicada en la fosforilación de la proteína tau. Se estudió la expresión de los niveles de proteína de CDK5, su subunidad activadora p35 y la forma truncada de p35, p25. En ratas Wistar, la administración oral, por consumo en la bebida, de DPIN disminuyó significativamente la cantidad de p25 (prueba de la t para datos independientes:  $t = 4,869$ ,  $df = 14$ ; valor de  $P = 0,0002$ ; figura 8A), así como de la subunidad p35 (prueba de la t para datos independientes:  $t = 2,245$ ,  $df = 15$ ; valor de  $P = 0,0402$ ; figura 8A). La cantidad total de CDK5 no varía (prueba de la t para datos independientes:  $t = 1,623$ ,  $df = 14$ ; valor de  $P = 0,1268$ ; figura 8A). Estos resultados indican una clara inactivación de la cinasa CDK5 en ratas Wistar después de la administración de DPIN.

40 45 2.3. La actividad de glucógeno sintasa cinasa-3 beta (GSK-3 $\beta$ ) no se ve afectada en el hipocampo de ratas Wistar después del tratamiento con DPIN.

50 55 Debido a la interacción entre la actividad cinasa de GSK-3 $\beta$  y la fosforilación de la proteína tau, se analizaron la expresión y la fosforilación de esta proteína cinasa. Es bien reconocido que la fosforilación de serina-9 (S9) en GSK-3 $\beta$  hace que la cola N-terminal actúe como pseudo-sustrato, dificultando la unión de los sustratos reales, inhibiendo así GSK-3. Esta inhibición de actividad se traduce en una disminución de la fosforilación de tau, ya que GSK-3 $\beta$  es una de las principales tau cinasas. En este ejemplo, el objetivo era estudiar el papel de esta tau cinasa (GSK-3 $\beta$ ) en ratas Wistar.

60 65 La administración oral de DPIN o DCI no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación de serina-9 (ANOVA unifactorial:  $F_{(2,22)} = 1,809$ , valor de  $P = 0,1874$ ; figura 9A.1) o tirosina-216 (ANOVA unifactorial:  $F_{(2,22)} = 1,088$ , valor de  $P = 0,3543$ ; figura 9A.2). Esto significa que no hay potenciación ni inhibición de la actividad cinasa (ANOVA unifactorial:  $F_{(2,22)} = 2,473$ , valor de  $P = 0,1074$ ; figura 9A.3). En cuanto a los niveles relativos de proteína de GSK-3 $\beta$  total, no se hallaron diferencias estadísticas significativas después de la administración de tres compuestos (ANOVA unifactorial:  $F_{(2,22)} = 0,5308$ , valor de  $P = 0,5955$ ; figura 9A.4). Por tanto, en cuanto a la acción sobre GSK-3 $\beta$  en el hipocampo de ratas Wistar, el consumo en la bebida de DPIN o DCI durante 10 días no tiene ningún efecto.

60 65 2.4. La proteína cinasa activada por AMP (AMPK), la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK / ERK1/2) no están relacionadas con la desfosforilación de tau en el hipocampo.

65 Se evaluaron la activación de cinasa y la expresión total de proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK / ERK1/2), proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y proteína cinasa A (PKA) para analizar si esas cinasas estaban implicadas en los resultados de tau anteriores. Tal como se muestra en la figura 10, las ratas Wistar presentan un

aumento significativo de la cantidad total de PKA con la administración por consumo en la bebida de DPIN (prueba de la t para datos independientes:  $t = 3,795$ , df = 14; valor de P = 0,0020; figura 10A.2). No se observan otros cambios entre las demás cinasas.

## 5 Referencias

- 1.- Bettledi L, Foukas LC. Growth factor, energy and nutrient sensing signaling pathways in metabolic ageing. *Biogerontology*. Diciembre de 2017;18(6):913-929.
- 10 2.- Soriguer F, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the [email protected] Study. *Diabetologia*. Enero de 2012;55(1):88-93.
- 15 3.- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (diciembre de 1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach". *Nature*. 402 (6762): 656-60.
- 4.- Seim I, Amorim L, Walpole C, Carter S, Chopin LK, Herington AC (enero de 2010). "Ghrelin gene-related peptides: multifunctional endocrine / autocrine modulators in health and disease". *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 37 (1): 125-31.
- 20 5.- Strasser F. Clinical application of ghrelin. *Curr Pharm Des*. 2012;18(31):4800-12.
- 6.- Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH (enero de 2010). "Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism". *Frontiers in Neuroendocrinology*. 31 (1): 44-60.
- 25 7.- Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM, Fujimiya M (marzo de 2004). "Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ". *The FASEB Journal*. 18 (3): 439-56.
- 30 8.- Alamri BN, Shin K, Chappe V, Anini Y. The role of ghrelin in the regulation of glucose homeostasis. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 1 de abril de 2016;26(1):3-11.
- 9.- Pena-Bello L, Pertega-Diaz S, Outeiriño-Blanco E, Garcia-Buela J, Tovar S, Sangiao-Alvarellos S, Dieguez C, Cordido F. Effect of oral glucose administration on rebound growth hormone release in normal and obese women: the role of adiposity, insulin sensitivity and ghrelin. *PLoS One*. 17 de marzo de 2015;10(3):e0121087.
- 35 10.- Leinonen T, Antero Kesäniemi Y, Hedberg P, Ukkola O. Serum ghrelin and prediction of metabolic parameters in over 20-year follow-up. *Peptides*. Febrero de 2016;76:51-6.
- 11.- Martins L, Fernández-Mallo D, Novelle MG, Vázquez MJ, Tena-Sempere M, Nogueiras R, López M, Diéguez C. Hypothalamic mTOR signaling mediates the orexigenic action of ghrelin. *PLoS One*. 2012;7(10):e46923.
- 40 12.- Yada T, Damdindorj B, Rita RS, Kurashina T, Ando A, Taguchi M, Koizumi M, Sone H, Nakata M, Kakei M, Dezaki K. Ghrelin signalling in  $\beta$ -cells regulates insulin secretion and blood glucose. *Diabetes Obes Metab*. Septiembre de 2014;16 supl. 1:111-7.
- 13.- Kurashina T, Dezaki K, Yoshida M, Sukma Rita R, Ito K, Taguchi M, Miura R, Tominaga M, Ishibashi S, Kakei M, Yada T. The  $\beta$ -cell GHSR and downstream cAMP/TRPM2 signaling account for insulinostatic and glycemic effects of ghrelin. *Sci Rep*. 15 de septiembre de 2015;5:14041.
- 45 14.- Dang NT, Mukai R, Yoshida K, Ashida H. D-pinitol and myo-inositol stimulate translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle of C57BL/6 mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(5):1062-7.
- 15.- Yap A, Nishiumi S, Yoshida K, Ashida H. Rat L6 myotubes as an in vitro model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. *Cytotechnology*. Diciembre de 2007;55(2-3):103-8.
- 50 16.- Nass R, Farhy LS, Liu J, Pezzoli SS, Johnson ML, Gaylinn BD, Thorner MO. Age-dependent decline in acyl-ghrelin concentrations and reduced association of acyl-ghrelin and growth hormone in healthy older adults. *J Clin Endocrinol Metab*. Febrero de 2014;99(2):602-8.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición, composición farmacéutica o composición nutracéutica o alimenticia o suplemento dietético, que comprende D-pinitol o cualquier sal del mismo, para su uso en la prevención o ralentización del inicio de una taupatía en un sujeto, en donde la taupatía se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de gramos argirófilos, taupatías gliales globulares, taupatía primaria relacionada con la edad que incluye demencia con ovillos neurofibrilares, encefalopatía traumática crónica (ETC), y astrogliopatía tau relacionada con el envejecimiento.
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la composición es una composición farmacéutica que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
3. Composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la composición es un suplemento dietético.
4. Composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la composición es una composición nutracéutica.
5. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha composición se administra por vía oral o por vía intragástrica.
6. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición se administra a un sujeto sano que no padece ninguna manifestación clínica de una taupatía.

25

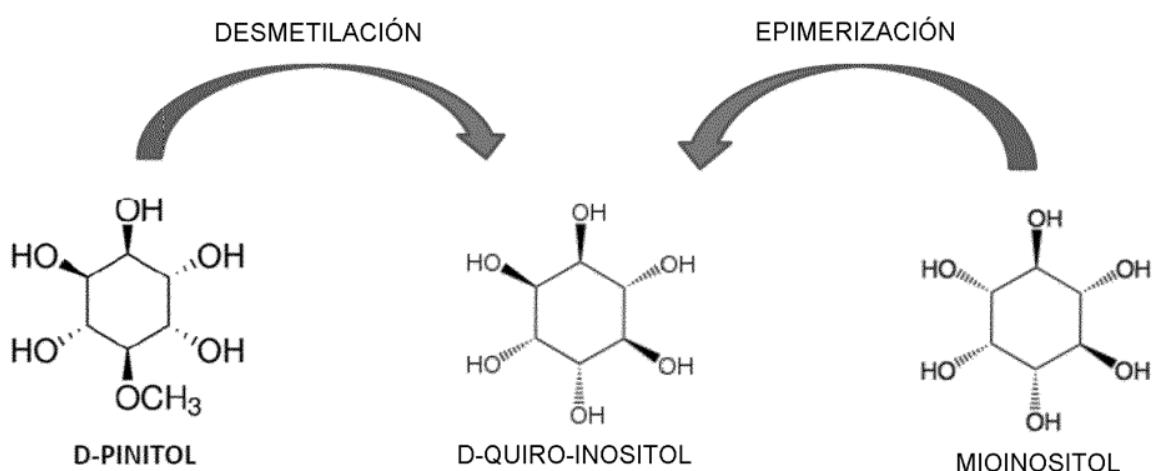


Fig. 1

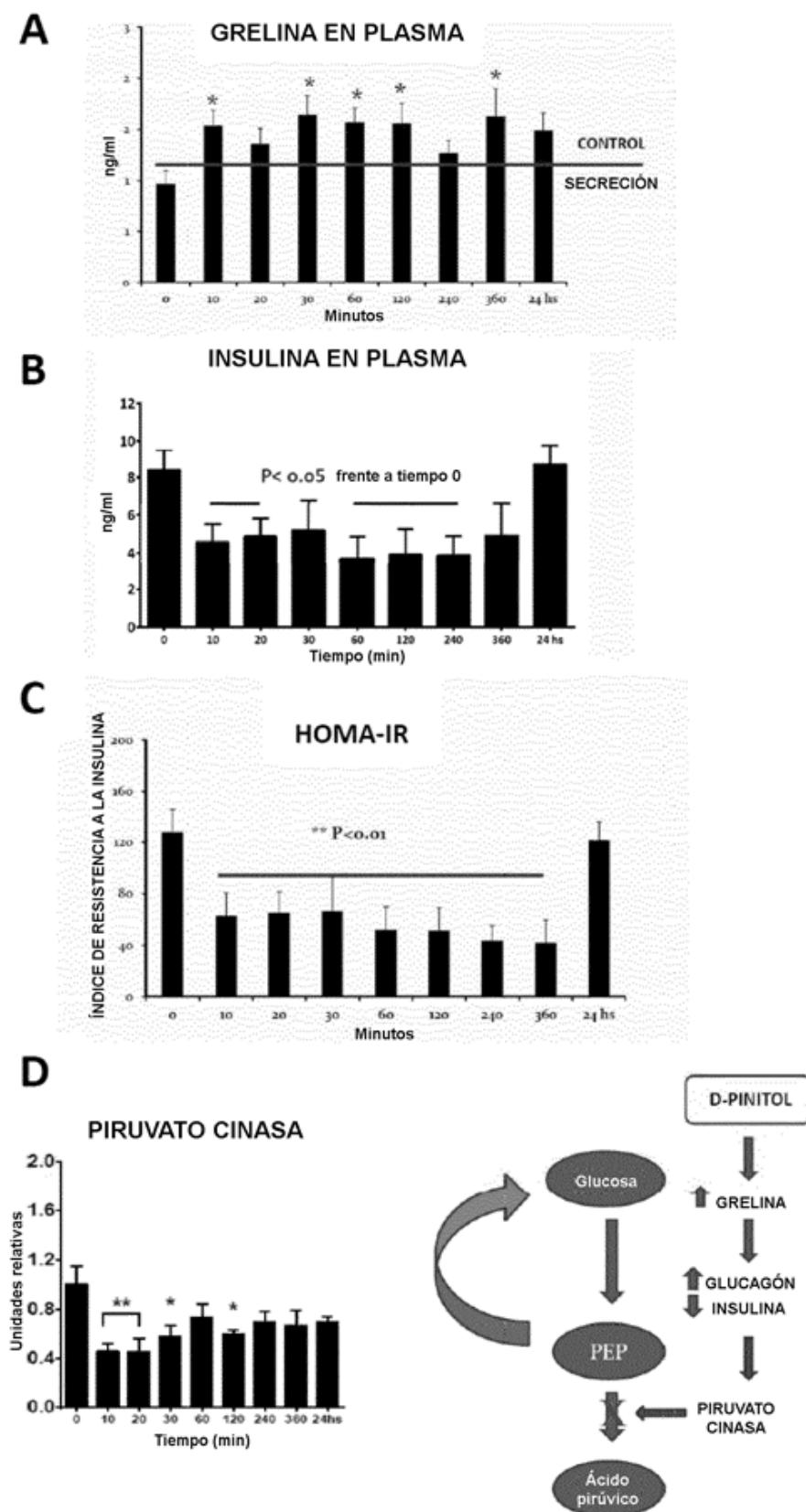


Fig. 2

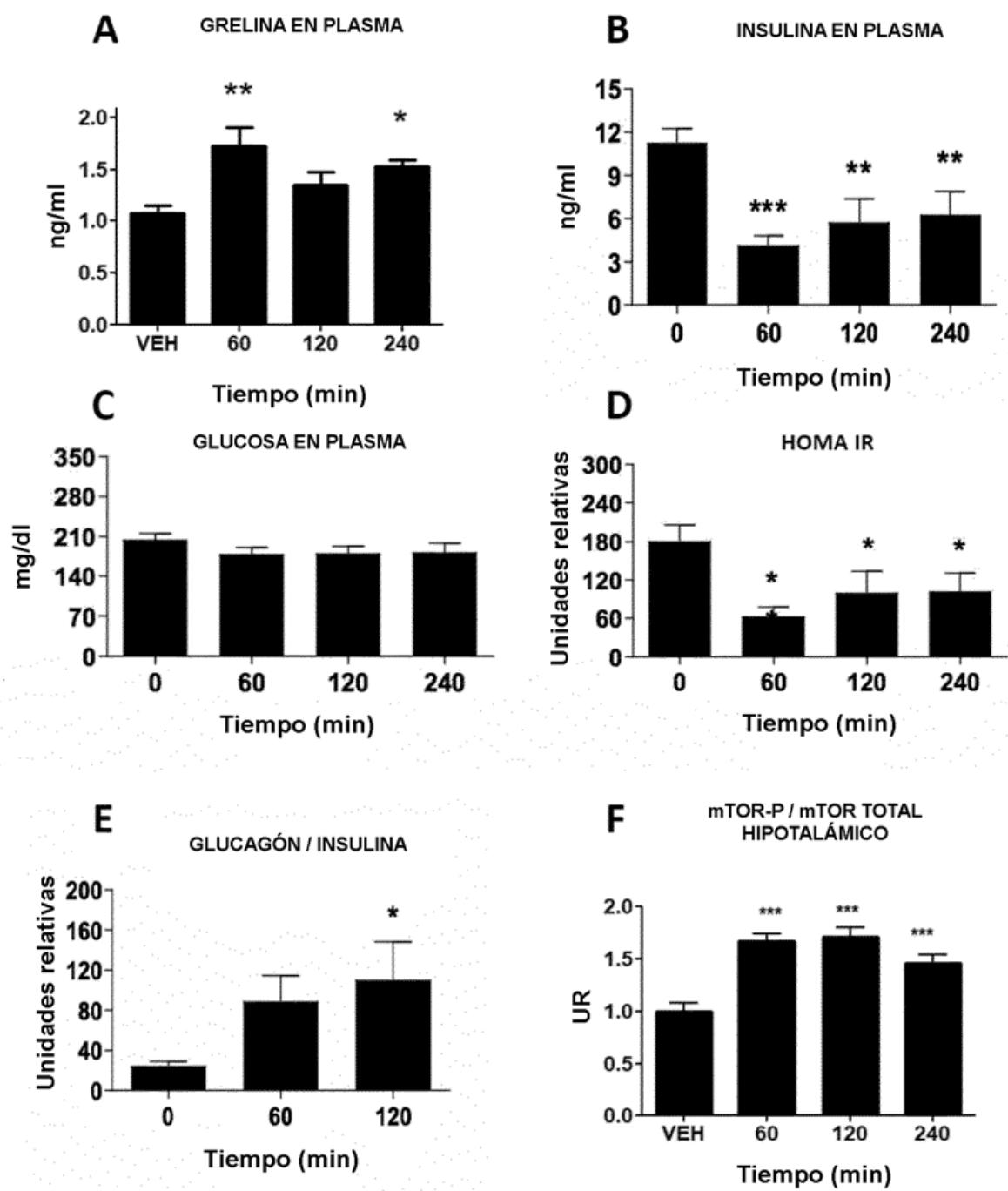


Fig. 3

## GRELINA EN PLASMA

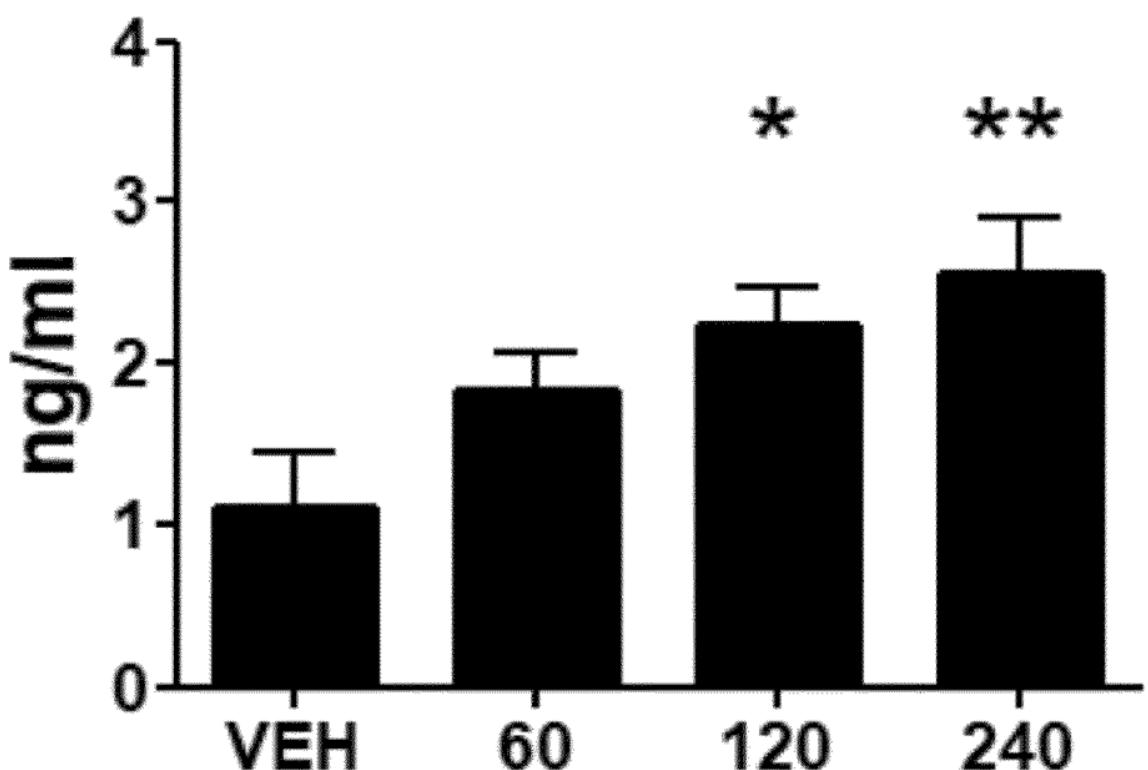
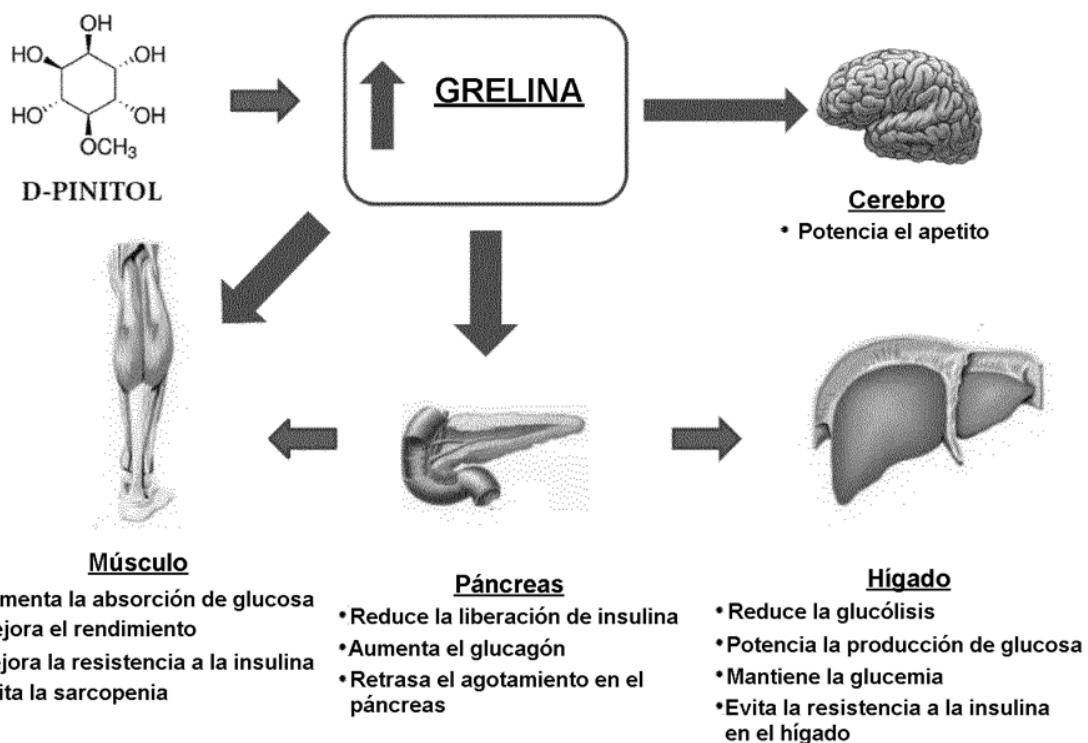


Fig. 4

**EL USO DE D-PINITOL PODRÍA MEJORAR EL RENDIMIENTO MUSCULAR, EVITANDO RESISTENCIA A LA INSULINA Y LA DECREPITUD ASOCIADAS A LA EDAD**



**Fig. 5**

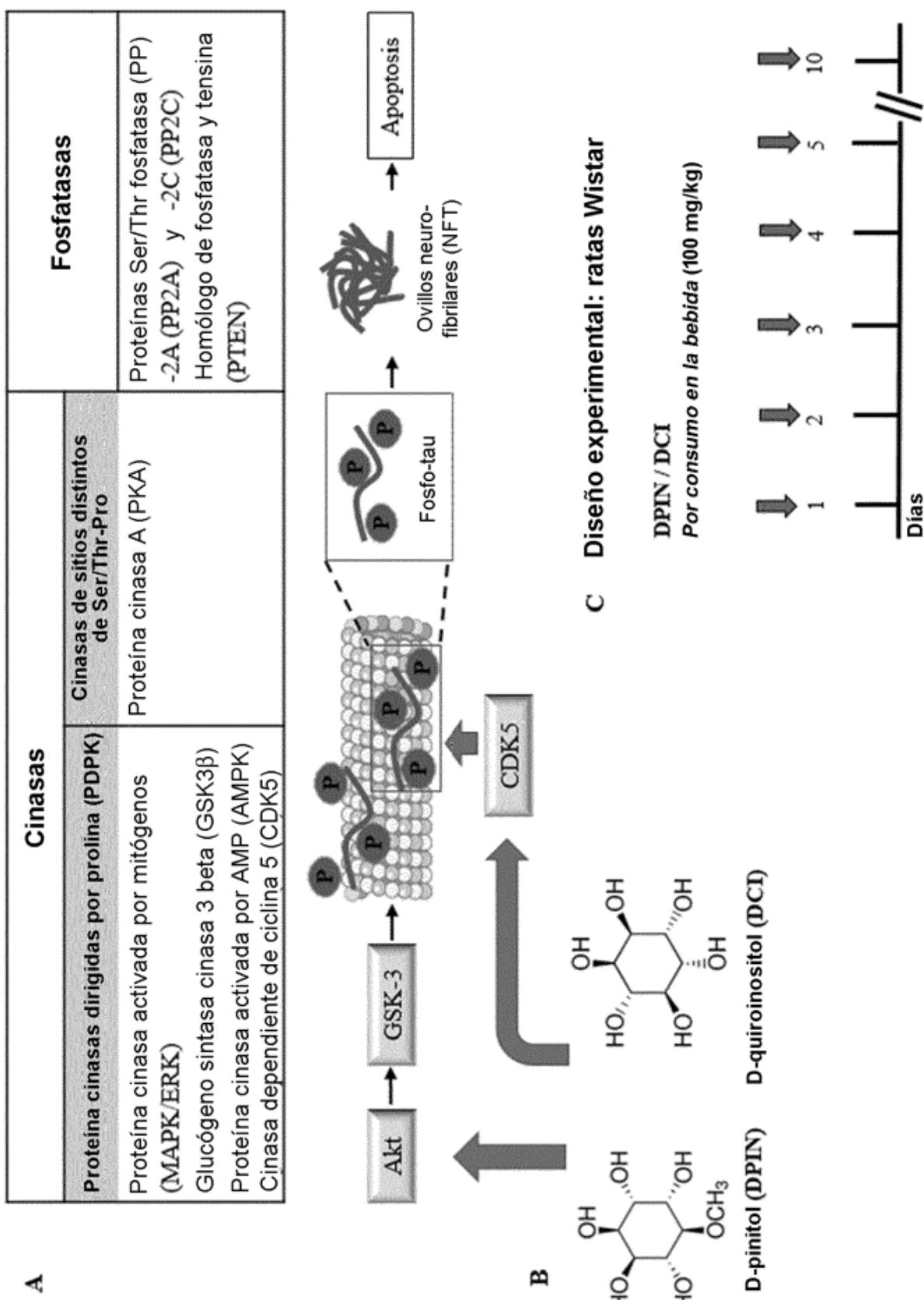
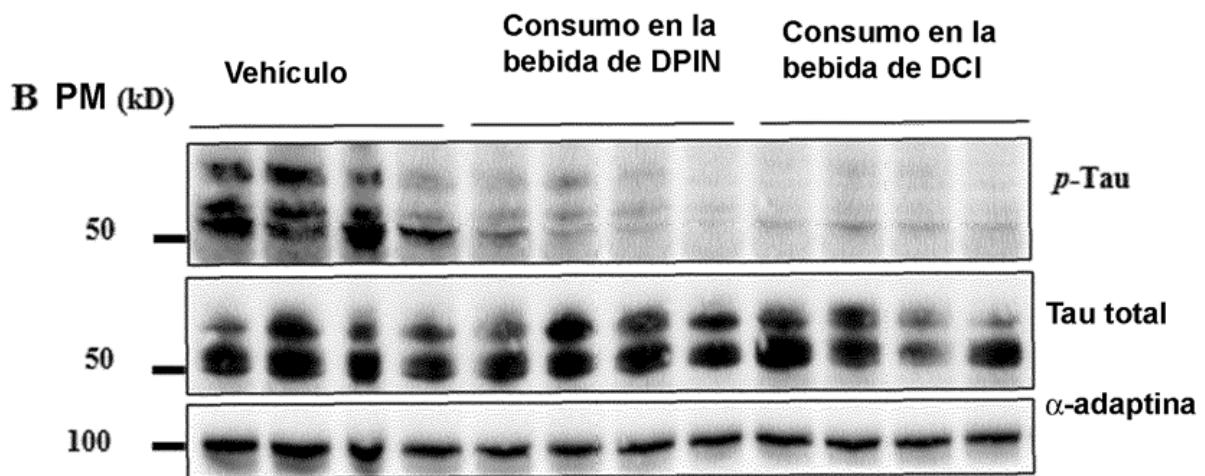
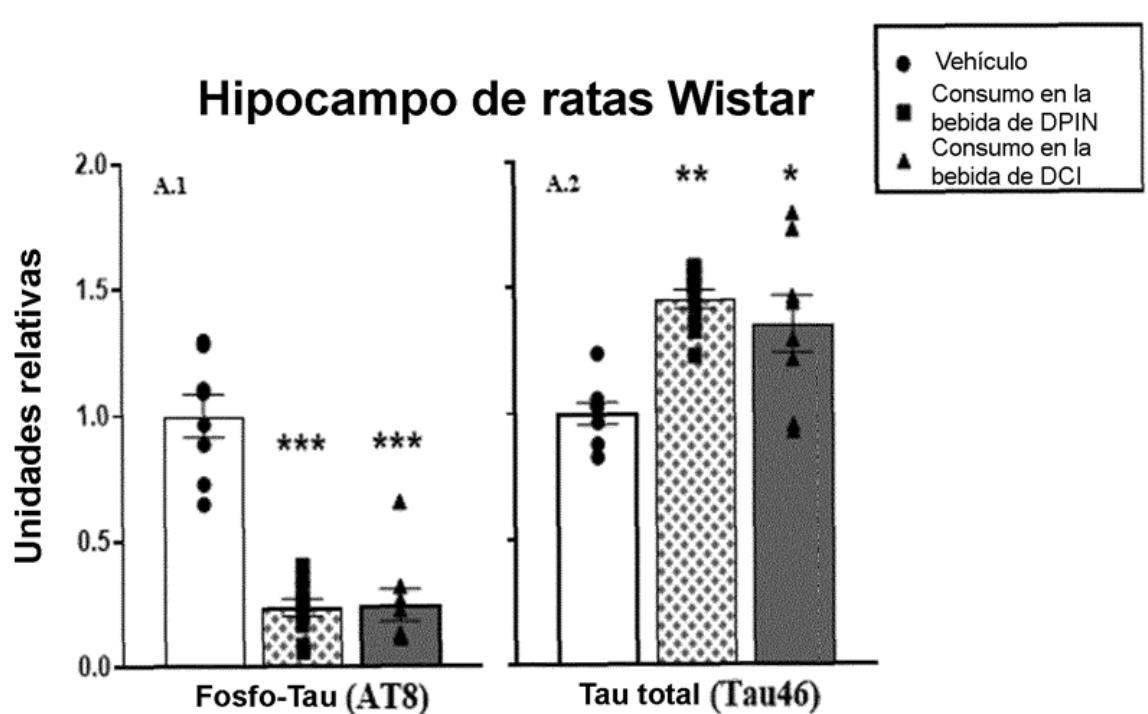
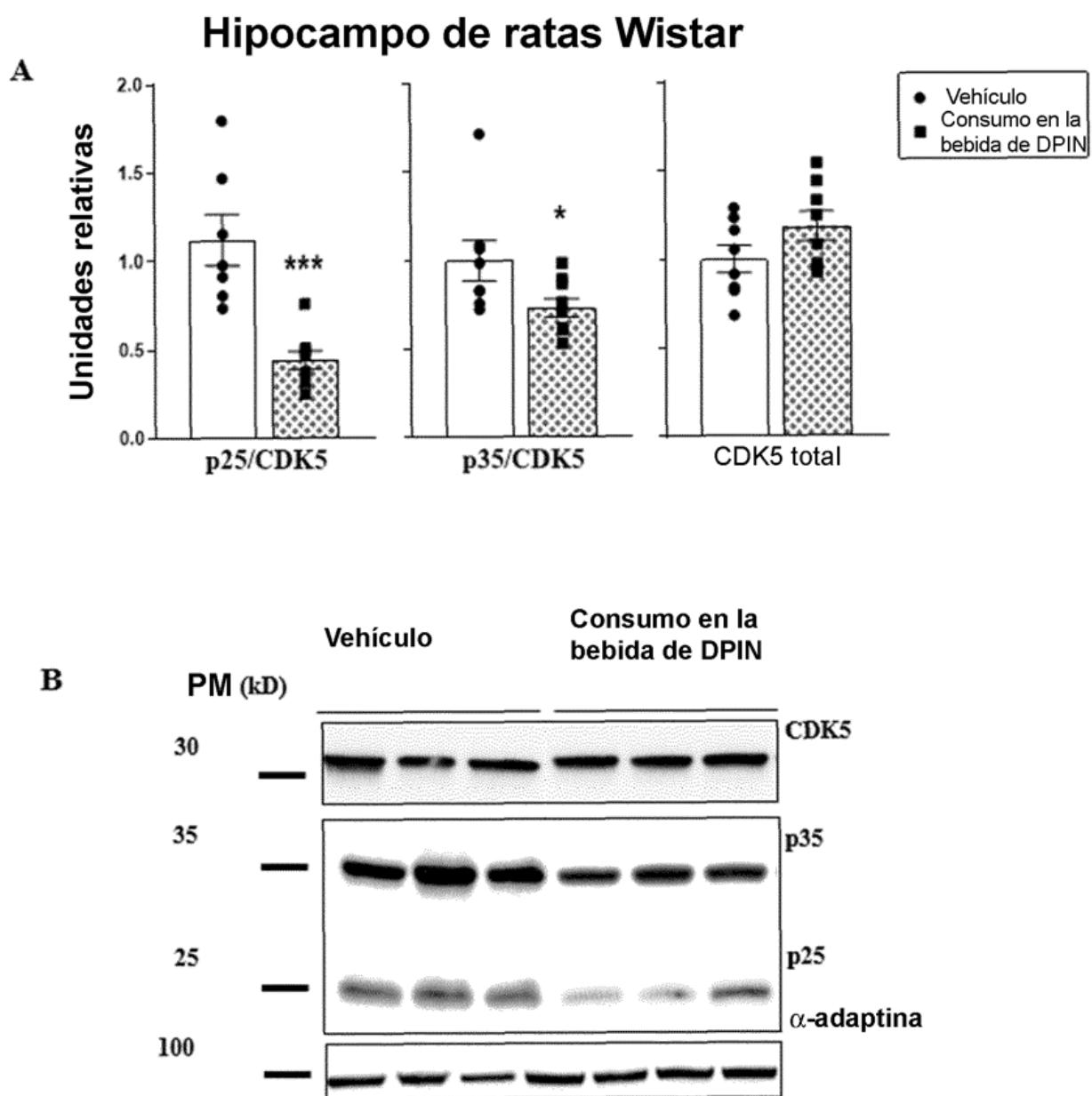


Fig. 6

**A****Fig. 7**

**Fig. 8**

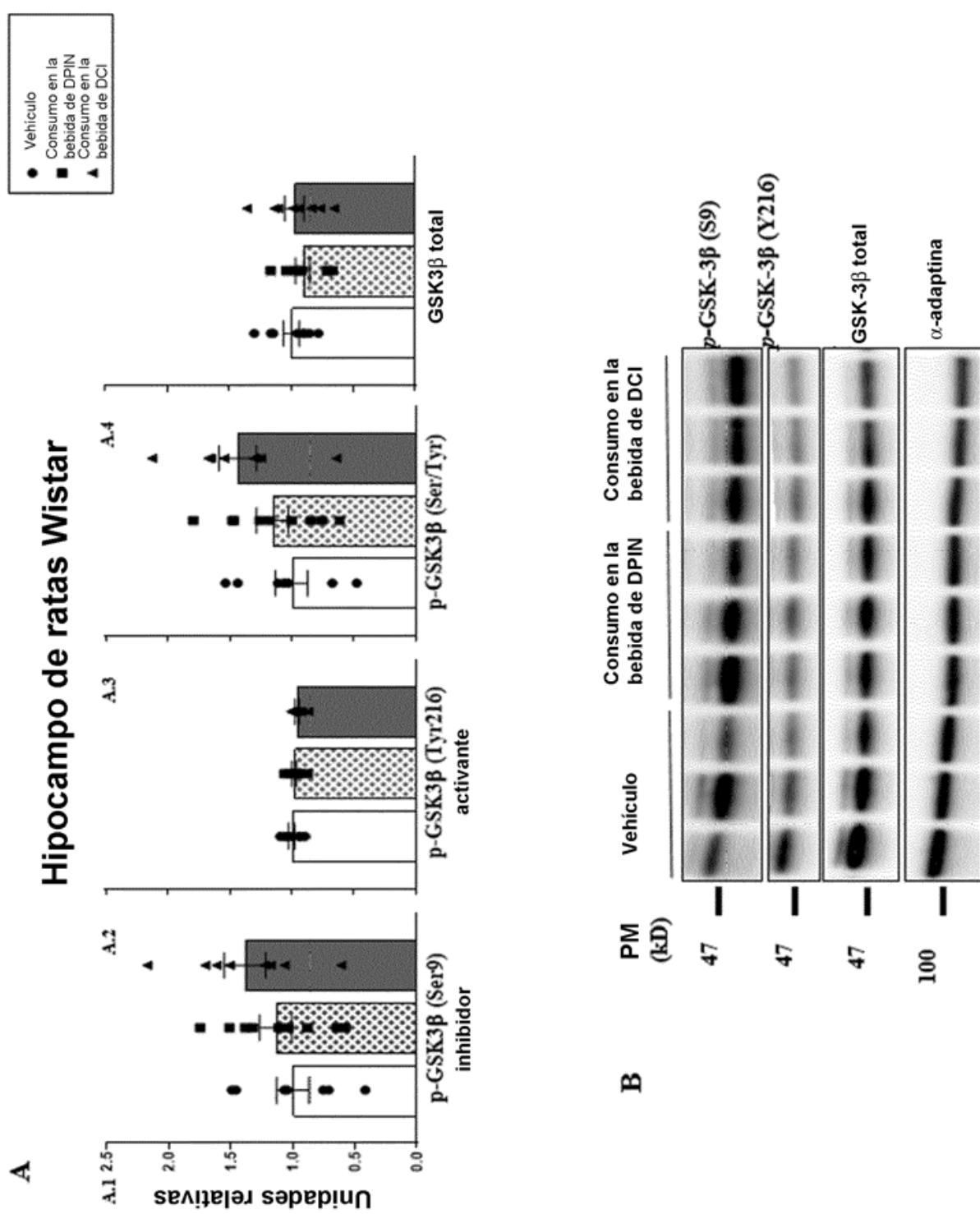


Fig. 9

## Hipocampo de ratas Wistar

A

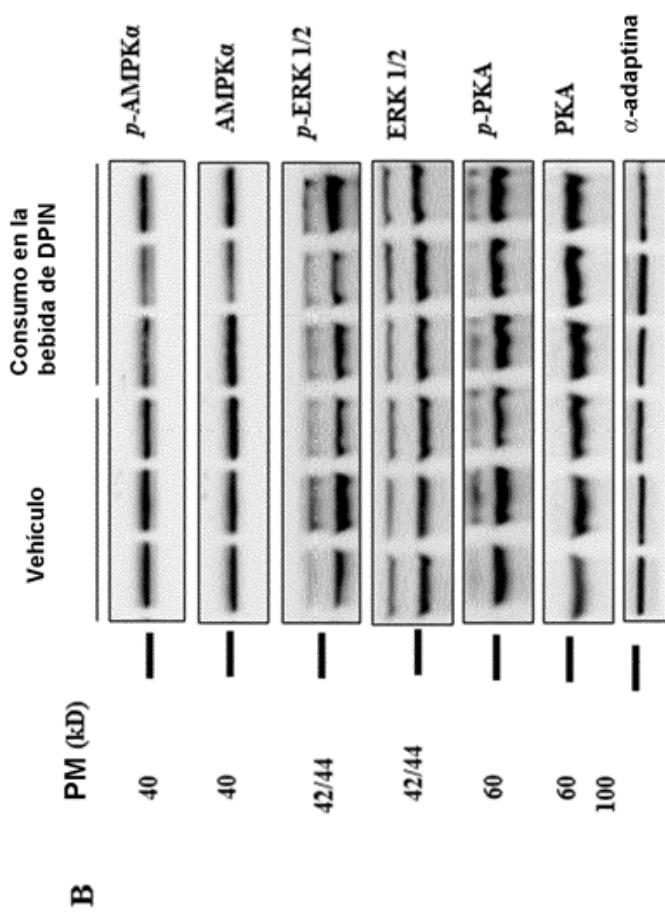
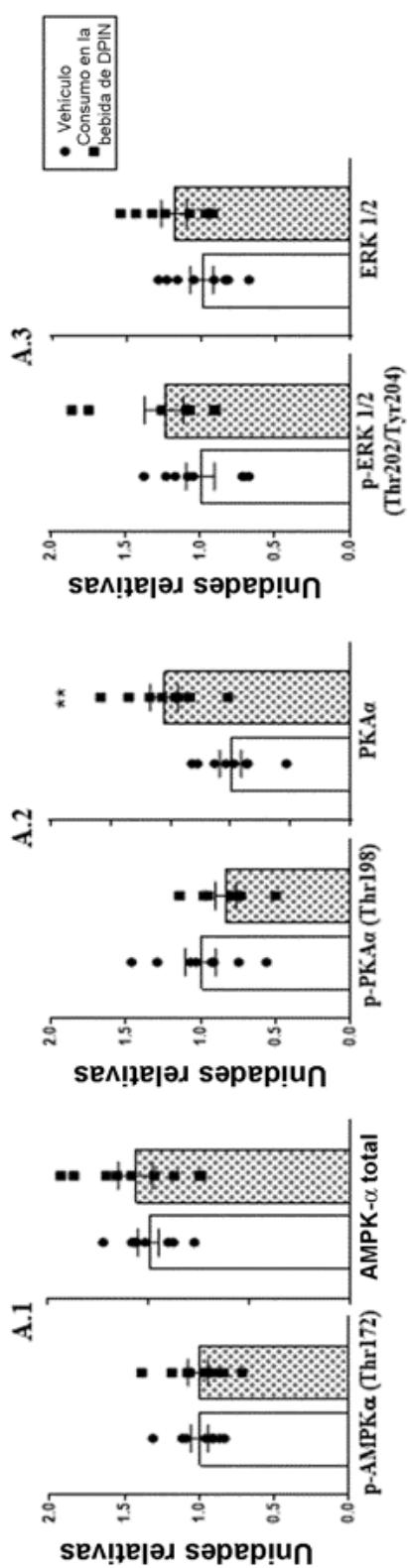


Fig. 10