



FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MENCIÓN NEUROCIENCIA

“DISPONIBILIDAD Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN EL CEREBRO DE UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”

Elizabeth Victoria Leiva Pastén

Tesis para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencia

Directora de Tesis:

Daniela López Espíndola

Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso

Centro Interdisciplinario de Investigación Biomédica e Ingeniería para la Salud MEDING, Universidad de Valparaíso

2025

AGRADECIMIENTOS

Comienzo agradeciendo a la Dra. Daniela López Espíndola, gracias por ser una guía excepcional, por su cercanía, confianza, enseñanzas y apoyo constante. Me siento profundamente honrada de formar parte de su equipo de investigación y de haber tenido la oportunidad de desarrollar y proponer experimentos en el marco de su proyecto. Gracias por abrirme la puerta a este mundo con tanta generosidad.

A mis compañeros y compañeras del Laboratorio de Neuroendocrinología, por el ambiente cálido y por compartir experimentos, cafés, frustraciones y logros. En especial, a Daniela González, por su apoyo en las gestiones del laboratorio durante el periodo en que tuve que enfocarme por completo en la escritura.

Al financiamiento otorgado por ANID al proyecto Fondecyt de Iniciación N°11230727. Al financiamiento otorgado por el Centro Interdisciplinario de Investigación Biomédica e Ingeniería para la Salud (MEDING). Al programa de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencia y a todos sus profesores.

A mis compañeras del Magíster, una hermosa generación exclusiva de mujeres: Paulina Muñoz, Javiera Moya, Sissi Fuentealba, Daphne Fuentes, Arabia Olea, Fanny Ahumada, Yael Flores. Fue un verdadero placer compartir clases, estudios y discusiones con ustedes. Gracias por hacer más liviano este camino.

A Alejandra Moller y Juan Varas, gracias por su apoyo y por las conversaciones que siempre lograron sacarme una sonrisa. A Claudio Córdova, por su generosidad al enseñarme con paciencia el uso de ImageJ, a Marvin Querales, por su valiosa ayuda con los análisis estadísticos, y a Camila Escobar por las interminables qPCR en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Medicina.

A mis amigos de toda la vida: Franco, Kimberly, Rodrigo, Pablo, Bastián, Benjamín, Gabriel, Máximo, y la infinidad de otras amistades que siempre me han dado su apoyo.

Agradezco profundamente a mis padres, por su amor incondicional, por acompañarme en cada etapa de este camino y por estar presentes incluso en los pequeños gestos cotidianos: por escucharme practicar cada presentación, por tenerme siempre un plato de comida caliente al llegar cansada y por esos té que aparecían en el escritorio justo cuando más los necesitaba.

A Renato, gracias por tu amor, por tu paciencia infinita y por comprender el tiempo y la energía que este proceso demandaba. Gracias por darme el espacio para concentrarme cuando lo necesitaba, y por saber cuándo sacarme de la casa para respirar.

Me agradezco a mí misma. Por la constancia, por el trabajo duro, y por permitirme disfrutar genuinamente este proceso.

Finalmente, a mi gatito Jack.

INDICE

1.	RESUMEN	5
2.	ABSTRACT	6
3.	INTRODUCCIÓN	7
3.1	ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	7
3.2	HORMONAS TIROIDEAS	9
3.3	TRANSPORTE DE HORMONAS TIROIDEAS HACIA EL CEREBRO	10
3.4	METABOLISMO CEREBRAL DE HORMONAS TIROIDEAS	11
3.5	MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS	12
3.6	DISFUNCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS	13
3.7	HORMONAS TIROIDEAS Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	13
4.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS	16
5.	OBJETIVOS	16
5.1	OBJETIVO GENERAL	16
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
6.	DISEÑO EXPERIMENTAL	17
7.	MATERIAL Y MÉTODOS	17
7.1	ANIMALES	18
7.2	EUTANASIA Y PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS	18
7.3	RADIOINMUNOENSAYO	18
7.4	ANÁLISIS MORFOLÓGICOS	19
7.5	INMUNOHISTOQUÍMICA	19
7.6	EXTRACCIÓN DE ARN Y PCR CUANTITATIVA CON TRANSCRIPCIÓN REVERSA	21
8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
9.	RESULTADOS	23
9.1	MENORES NIVELES PLASMÁTICOS DE T ₃ Y T ₄ EN RATONES MACHO 5XFAD	23
9.2	ALTERACIONES SEXO-DEPENDIENTES EN LA MORFOLOGÍA HIPOFISIARIA Y EXPRESIÓN DE TSH EN RATONES 5XFAD	24
9.3	ALTERACIONES SEXO-DEPENDIENTES EN LA MORFOLOGÍA DE LA GLÁNDULA TIROIDES EN RATONES 5XFAD	26
9.4	EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA FUNCIONALIDAD TIROIDEA EN RATONES 5XFAD	29
9.5	CONTENIDO NORMAL DE T ₃ Y T ₄ EN LA CORTEZA CEREBRAL Y EL HIPOCAMPO DE RATONES 5XFAD	32
9.6	MAYOR EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE HT MCT8 EN LA BHE DE MACHOS 5XFAD ...	34

9.7	EXPRESIÓN CONSERVADA DE Dio_2 Y Dio_3 EN EL CEREBRO DE RATONES 5XFAD	35
9.8	CAMBIOS REGIÓN- Y SEXO-ESPECÍFICOS EN LA EXPRESIÓN DEL GEN SENSIBLE A T_3 HR, Y EXPRESIÓN CONSERVADA DE LOS RECEPTORES <i>Thra1</i> Y <i>Thrb1</i>	36
10.	DISCUSIÓN	39
10.1	ALTERACIONES SEXO-DEPENDIENTES EN EL EJE HPT DEL MODELO 5XFAD	39
10.2	MODIFICACIONES SEXO- Y REGIÓN-DEPENDIENTES EN LA DINÁMICA DE HT EN EL CEREBRO 5XFAD 41	
11.	CONCLUSIONES	46
12.	BIBLIOGRAFÍA	47
13.	ANEXOS	62
13.1	ANEXO 1: ACTA DE APROBACIÓN CICUAL-UV Y DIRECCIÓN GENERAL DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN DE LA COMUNIDAD DE MADRID	62
13.2	ANEXO 2: ACTA DE CERTIFICACIÓN COMITÉ DE BIOSEGURIDAD DE LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO	64

1. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que afecta principalmente a adultos mayores y se caracteriza por pérdida progresiva de funciones cognitivas. A pesar de los avances, sus mecanismos fisiopatológicos no se comprenden completamente y no existen tratamientos efectivos basados en ellos. Estudios recientes han relacionado las hormonas tiroideas (HT) con la EA, ya que regulan genes clave como *APP* y *Tau*. Además, se ha observado una desregulación en los niveles de HT, tanto en pacientes como en modelos animales de EA, y el hipotiroidismo, que presenta signos similares a los de la EA, se considera un factor de riesgo. También se ha demostrado que los tratamientos con HT mejoran los síntomas cognitivos de la EA en pacientes hipotiroideos y en animales. Sin embargo, aún no se han explorado en profundidad los mecanismos involucrados en estas alteraciones ni la existencia de diferencias sexuales. Este estudio caracterizó los niveles de HT periféricos y centrales, su producción, entrada al cerebro, metabolismo y acción en ratones 5XFAD, modelo transgénico de la EA, y en animales controles (n=32, 7 meses, ambos sexos). Se midió T3 y T4 en plasma, corteza e hipocampo mediante radioinmunoensayo. La producción de HT se evaluó mediante morfometría e inmunohistoquímica para TSH, tiroglobulina, PAX-8 y TTF-1. La entrada cerebral de HT se analizó a través del transportador MCT8 en vasos sanguíneos corticales, el metabolismo mediante RT-qPCR de las enzimas *Dio2* y *Dio3*, y la acción de HT mediante la expresión del gen regulado por T3 *Hr* y de los receptores *Thra1* y *Thrb1* en corteza e hipocampo. Los resultados mostraron que las hembras 5XFAD presentan una disponibilidad periférica normal de HT, acompañada de una menor actividad funcional del eje hipófisis-tiroides, en comparación a las hembras controles. Por el contrario, los machos 5XFAD exhibieron niveles plasmáticos menores y una mayor actividad del eje, en comparación a su contraparte control. Los animales 5XFAD muestran contenido cerebral de T3 y T4 similares a los controles, sin embargo, los machos 5XFAD mostraron mayor presencia de MCT8 en los vasos sanguíneos corticales, sugiriendo un mecanismo compensatorio. No se detectaron alteraciones en la expresión cerebral de las desyodasas ni de los receptores; sin embargo, la expresión de *Hr* fue menor en las hembras 5XFAD, en comparación a los controles. Estos hallazgos sugieren que la EA afecta de manera sexo-específica la producción y la disponibilidad periférica de HT, así como su transporte al cerebro y la expresión de un gen dependiente de T3. Este estudio remarca la importancia de considerar las diferencias sexuales en los mecanismos de la enfermedad, y abre nuevas perspectivas para su estudio.

PALABRAS CLAVES

Enfermedad de Alzheimer, hormonas tiroideas, diferencias sexuales, modelo 5XFAD.

2. ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that primarily affects older adults and is characterized by the progressive loss of cognitive functions. Despite recent advances, its pathophysiological mechanisms remain incompletely understood, and there are no effective treatments targeting them. Recent studies have linked thyroid hormones (TH) to AD, as they regulate key genes such as APP and Tau. Moreover, dysregulation of TH levels has been observed in both patients and animal models of AD, and hypothyroidism, which shares clinical features with AD, is considered a risk factor. Treatment with TH has been shown to improve cognitive symptoms of AD in hypothyroid patients and animal models. However, the mechanisms underlying these alterations, as well as potential sex differences, remain poorly explored. This study characterized peripheral and central TH levels, their production, brain entry, metabolism, and action in 5XFAD transgenic mice, a model of AD, and in control animals (n=32, 7 months old, both sexes). T₃ and T₄ levels were measured in plasma, cortex, and hippocampus using radioimmunoassay. TH production was assessed through morphometry and immunohistochemistry for TSH, thyroglobulin, PAX-8, and TTF-1. Brain TH entry was analyzed by evaluating the transporter MCT8 in cortical blood vessels, metabolism by RT-qPCR for deiodinases *Dio2* and *Dio3*, and TH action through the expression of the T₃-regulated gene *Hr* and receptors *Thra1* and *Thrb1* in cortex and hippocampus. Results showed that female 5XFAD mice exhibited normal peripheral TH availability, accompanied by lower functional activity of the pituitary–thyroid axis compared to female controls. In contrast, male 5XFAD mice showed lower plasma TH levels and increased axis activity relative to controls. While 5XFAD mice displayed T₃ and T₄ brain content comparable to controls, males exhibited higher MCT8 expression in cortical blood vessels, suggesting a compensatory mechanism. No significant alterations were detected in the cerebral expression of deiodinases or TH receptors; however, *Hr* expression was lower in female 5XFAD mice compared to controls. These findings suggest that AD differentially affects, in a sex-specific manner, the production and peripheral availability of TH, as well as their transport into the brain and the expression of a T₃-dependent gene. This study highlights the importance of considering sex differences in AD mechanisms and opens new perspectives for future research.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, thyroid hormones, sex differences, 5XFAD model.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la pérdida progresiva de funciones cognitivas, como la memoria, comportamiento y lenguaje (1). La EA representa la mayoría de los casos de demencia, abarcando un 60 a 70% de ellos, según la Organización Mundial de la Salud (2). Actualmente, se estima que 55 millones de personas en el mundo padecen demencia, y se estima que esta cifra se elevará a 139 millones para el año 2050, debido al envejecimiento de la población (3). Por otro lado, en Chile el 1,06% de la población padece EA u otra demencia (4).

La EA tiene dos etiologías principales: una genética y otra esporádica. La EA genética se presenta a temprana edad (<65 años) y se caracteriza por mutaciones autosómicas dominantes (5) en los genes de la proteína precursora del amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2) (6). Por otro lado, la EA esporádica es la más común y se presenta en edades avanzadas (>65 años), siendo el envejecimiento su principal factor de riesgo (7).

La EA se caracteriza por rasgos neuropatológicos distintivos, como la atrofia en el lóbulo temporal e hipocampo; la acumulación de placas de β -amiloide (A β) y los ovillos neurofibrilares de proteína Tau hiperfosforilada en corteza cerebral e hipocampo (8,9). Respecto a las placas de A β , el procesamiento de APP puede seguir dos rutas: una no amiloidogénica, mediada por la acción inicial de la enzima α -secretasa, y otra amiloidogénica, en la que participan las enzimas β y γ -secretasas. Las proteínas PSEN1 y PSEN2 constituyen las subunidades catalíticas del complejo γ -secretasa, responsable del corte final de APP en la vía amiloidogénica, en donde la acción secuencial de las β y γ -secretasas sobre APP da origen a los péptidos A β (10). Actualmente, se reconoce que los oligómeros formados por la isoforma de 42 aminoácidos del péptido A β (A β ₄₂) desempeñan un papel central en la fisiopatología de la EA, debido a su alta propensión a la agregación e insolubilidad (11). Por su parte, la proteína Tau es una proteína asociada a microtúbulos, donde participa en su estabilización mediante la modulación de la polimerización de la tubulina (12), contribuyendo así al mantenimiento de la estructura y función neuronal. En este contexto, la hiperfosforilación y acumulación de Tau en ovillos neurofibrilares se ha identificado como un evento patológico clave en el desarrollo y progresión de la EA (13).

Se ha sugerido que la acumulación de estas moléculas anómalas podría causar neurotoxicidad, cambios patológicos en las espinas dendríticas y defectos en la función sináptica (14,15). Sin embargo, estos mecanismos no logran explicar completamente las causas subyacentes de la EA (16), por lo que en los últimos años se han considerado sólo como epifenómenos de la enfermedad (17) y se han abierto nuevas líneas de investigación para intentar comprender la complejidad de los procesos fisiopatológicos asociados a la EA.

En este contexto, los modelos animales se han convertido en herramientas fundamentales para profundizar en la fisiopatología de la enfermedad y evaluar potenciales estrategias terapéuticas. Los modelos animales se clasifican en tres grandes grupos: espontáneos, de intervención y genéticamente modificados (18).

Los modelos espontáneos se basan en animales envejecidos que de manera natural presentan declive cognitivo, así como alteraciones conductuales, neuroquímicas y morfológicas asociadas a la demencia y a la EA (19,20). Por otro lado, los modelos de intervención consisten en la administración de fármacos para manipular vías neuronales específicas, o en la administración continua de A β directamente al cerebro (18,21–23). Finalmente, los modelos genéticamente modificados han recibido especial atención, dado que los avances en ingeniería genética permiten reproducir las principales características de la EA sin intervenciones quirúrgicas o farmacológicas, y sin la necesidad de esperar largos periodos para la aparición de los síntomas. Estos modelos emplean mutaciones en genes como *APP*, *PSEN1* y *Tau*, entre otros. Entre los modelos genéticos más utilizados se encuentran *APP/PS1* (24), *3XTg* (25), y *5XFAD*. Este último se caracteriza por un rápido desarrollo de las alteraciones típicas de la EA, debido a que combina la mutación Sueca en *APP* (K670N/M671L) en el sitio de procesamiento de la β -secretasa (26), junto con las mutaciones Florida (I716V) (27) y Londres (V717I) (28) en el sitio de procesamiento de la γ -secretasa, además de dos mutaciones adicionales en el gen *PSEN1* (M146V y L286V) (29), que en conjunto potencian la generación del péptido A β_{42} y aceleran la patogénesis amiloide (30).

Con la ayuda de los modelos animales, actualmente laboratorios de todo el mundo están dedicados al estudio de nuevas vías implicadas en la fisiopatología de la EA, incluyendo la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la neuroinflamación, las que son consideradas clave en el inicio y/o progresión de la enfermedad (31). La hipótesis mitocondrial propone que las mutaciones en el ADN mitocondrial reducen la eficiencia bioenergética y aumentan el estrés oxidativo, generando un ciclo de daño que conduce, en última instancia, a una crisis energética que promueve la degeneración neuronal (32,33). En este escenario, se han observado un incremento de los fenómenos de producción de A β , hiperfosforilación de Tau, pérdida sináptica y, finalmente, la neurodegeneración (34). Por otra parte, la neuroinflamación se plantea como un mecanismo central en la EA, en el cual la activación crónica de astrocitos y microglía, junto con la liberación de numerosas citoquinas proinflamatorias, favorece la acumulación de A β y ovillos neurofibrilares de Tau, potenciando la neurodegeneración y la progresión de la EA (35).

Finalmente, entre las nuevas líneas de investigación, recientemente se ha propuesto una asociación entre las hormonas tiroideas (HT) y la EA, abriendo nuevas vías para comprender los mecanismos subyacentes de la enfermedad.

3.2 HORMONAS TIROIDEAS

La tiroxina (T₄ o 3,5,3',5' tetrayodo-L-tironina) y la triyodotironina (T₃ o 3,5,3' triyodo-L-tironina) son las hormonas sintetizadas y secretadas por la glándula tiroides (36). Su liberación es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HPT): las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo secretan la hormona liberadora de tirotropina (TRH), que promueve la liberación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) por parte de las células tirotropas de la glándula hipófisis. A su vez, la TSH estimula la síntesis y secreción de HT en las células foliculares de la glándula tiroides. Finalmente, las hormonas T₃ y T₄ en la sangre regulan negativamente la liberación de TRH y TSH (37).

La T₄ es la principal hormona liberada por la glándula tiroides, representando un 93%, en contraste con la T₃, que corresponde al 7% (38). La síntesis de HT se realiza en los folículos tiroideos, y depende de la disponibilidad de micronutrientes, como el yodo y el selenio (39). Para este proceso es necesario el ingreso de yodo en forma de yoduro a través del cotransportador de yoduro-sodio (NIS), presente en la membrana plasmática basolateral de las células foliculares (40). Posteriormente, el yoduro se transporta hacia el coloide a través del transportador pendrina (41), donde es oxidado por la enzima peroxidasa tiroidea (TPO). El yodo oxidado se une a los residuos de tirosina de la tiroglobulina (TG), un proceso que también es catalizado por la TPO, formando monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT) (42). Luego, las hormonas T₃ y T₄ se producen mediante reacciones de acoplamiento oxidativo de DIT y MIT (43). Posteriormente, las células foliculares internalizan la TG yodada mediante pinocitosis (44,45), a través de la formación de pequeñas vesículas en las zonas apicales de la membrana plasmática. La TG yodada es transportada hacia los lisosomas, donde es degradada por proteasas (46). Este proceso de proteólisis libera como productos MIT, DIT, T₃, T₄, además de otras yodotirosinas en menor proporción, junto con aminoácidos (47). Finalmente, T₃ y T₄ son transportadas a la circulación sanguínea principalmente mediante el transportador de monocarboxilato 8 (MCT8), y en menor medida por transportador de monocarboxilato 10 (MCT10) (48,49).

Las características morfológicas de los folículos tiroideos son indicadores directos de su actividad funcional. La altura del epitelio folicular se correlaciona con su estado: un epitelio columnar refleja alta actividad, mientras que uno plano indica hipoactividad (50,51). A nivel del coloide, la presencia de zonas de reabsorción, evidencian vacuolas endocíticas de un intenso proceso de endocitosis y, por ende, mayor actividad folicular (50,52,53). Finalmente, la distribución de la TG es un marcador funcional dinámico. En condiciones normales, la TG recién sintetizada se concentra en la región apical y es rápidamente endocitada para la producción de HT, mientras que el exceso se almacena en el coloide de forma más estable, fenómeno descrito como “*last-come, first-served*” (54). Así, la predominancia de TG en el borde apical refleja una alta actividad secretora, mientras que su acumulación en el coloide indica una menor utilización funcional.

La síntesis de HT es regulada principalmente por la activación del receptor de TSH, un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G (55,56). La señalización a través de su subunidad alfa activa mecanismos que regulan la proliferación de células foliculares, la producción y liberación de HT (57,58). Esta cascada de señalización culmina en la activación de factores de transcripción tiroideos, como *transcription thyroid factor-1* (TTF-1) y *paired-box-8* (PAX-8), los cuales regulan la diferenciación de la tiroides y la expresión de genes clave en la síntesis de HT (59), tales como NIS (60,61), TPO (62) y TG (63,64).

Una vez las HT son liberadas a la circulación sanguínea, solo una pequeña fracción circula en forma libre, mientras que la gran mayoría se encuentra agregada a proteínas de unión a HT, tales como la globulina transportadora de tiroxina (TBG), la transtiretina (TTR) y la albúmina (65). Entre ellas, la TBG es la más abundante y presenta la mayor afinidad por las TH, seguida por TTR, y en menor grado, la albúmina (66). Además de facilitar su transporte, estas proteínas protegen a las HT del medio acuoso plasmático y actúan como un reservorio dinámico que amortigua variaciones transitorias en las concentraciones libres de T₃ y T₄, garantizando así un suministro constante hacia los tejidos blanco (67,68).

3.3 TRANSPORTE DE HORMONAS TIROIDEAS HACIA EL CEREBRO

Para alcanzar el parénquima cerebral, las HT deben atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLCR) a través de transportadores específicos. La BHE presenta una superficie que es 5.000 veces mayor en comparación con la de la BSLCR (69). Por esta razón, la mayor parte de las HT ingresan al cerebro a través de la BHE, representando alrededor del 80%, en comparación con el 20% que lo hace a través de la BSLCR (70). Además, la BHE presenta una menor distancia entre neuronas y microvasculatura (69). Debido a estas características, la BHE es el sitio más relevante para estudiar el transporte de HT hacia el parénquima cerebral (71).

Las HT atraviesan las barreras cerebrales mediante transportadores para distribuirse en el líquido extracelular, desde donde ingresan a las células neurales también a través de proteínas transportadoras. Los transportadores de HT son proteínas transmembrana que pertenecen a la superfamilia del gen portador de solutos (SLC), con diversas variantes distribuidas de manera diferente en los tejidos del organismo. Los transportadores más relevantes en tejido cerebral son MCT8 y polipéptidos transportadores de aniones orgánicos 1C1 (OATP1C1), debido a que son los más abundantemente expresados en las barreras cerebrales (72).

La función de estas proteínas es facilitar el paso de HT desde la circulación sanguínea hacia el parénquima cerebral y desde el espacio extracelular a las células diana (72–74). El transportador MCT8 es una proteína de 12 dominios transmembrana (75) que permite el paso exclusivo de HT a través de la membrana plasmática, permeando T₄, T₃, rT₃ (3,3',5' triyodo-L-tironina) y T₂ (3,3' diyodo-L-tironina) dentro y fuera de la célula, con una mayor afinidad por T₃ (74,76). El transportador OATP1C1, también una proteína con 12

dominios transmembrana (77,78), permite el paso de manera específica de T₄, rT₃ y formas sulfatadas de T₄ (73,79). Tanto MCT8 como OATP1C1 se han identificado en las células endoteliales de la BHE, en células epiteliales de la BSLCR y en ependimocitos (80,81), así como en distintos tipos de células cerebrales, incluyendo neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y glía radial (82–84).

Es importante señalar que existen diferencias significativas en la expresión de estos transportadores entre roedores y humanos. En roedores, la BHE expresa tanto MCT8 como OATP1C1. Sin embargo, en humanos y otros primates, la BHE contiene MCT8, pero muestra escasas cantidades de OATP1C1 (81,85). En este contexto, modelos roedores experimentales han demostrado que la ausencia de MCT8 reduce el ingreso de T₃ al cerebro; sin embargo, la presencia de OATP1C1 permite que T₄ continúe ingresando y se convierta localmente en T₃, evitando alteraciones severas. En cambio, la doble delección de MCT8 y OATP1C1 genera una privación hormonal cerebral grave, con consecuencias estructurales y funcionales significativas (86).

3.4 METABOLISMO CEREBRAL DE HORMONAS TIROIDEAS

La disponibilidad de HT en el cerebro depende tanto de su ingreso desde la circulación sanguínea, como de una fina regulación intracelular por parte de las enzimas desyodasas, especialmente en neuronas y astrocitos.

El principal mecanismo para generar T₃ localmente en el cerebro es mediante la conversión de T₄ a T₃, siendo responsable de hasta el 80% de la T₃ activa generada de esta manera (87), mientras que, en roedores se estima que la mitad de la T₃ cerebral se origina de la conversión local y la otra proviene directamente del plasma sanguíneo (88). A través del proceso de desyodación secuencial, las enzimas desyodasas, un grupo de selenoproteínas, regulan los niveles intracelulares de HT mediante su activación e inactivación (89). Existen tres tipos de desyodasas: DIO1, DIO2 y DIO3. Tanto DIO1 como DIO2 convierten T₄ en T₃ e inactivan T₃ en T₂ mediante la eliminación del yodo en la posición 5' del anillo externo. En contraste, DIO3 lleva a cabo la desyodación en la posición 5 del anillo interno, lo que inactiva tanto T₄ como T₃, produciendo rT₃ y T₂, respectivamente (90,91).

Se ha demostrado una expresión predominante de *Dio2* en astrocitos y tanicitos (92,93), y expresión de *Dio3* en neuronas piramidales del hipocampo y corteza cerebral (94). En consecuencia, las neuronas, que son las principales células objetivo de T₃, dependen del suministro de esta hormona que proporcionan los astrocitos circundantes (95) y regulan las concentraciones intracelulares en forma independiente según sus necesidades fisiológicas.

En consecuencia, los niveles cerebrales de DIO2 y DIO3 son esenciales para mantener la homeostasis en el cerebro y así la correcta función en las HT en la regulación de la expresión de los genes dependientes de T₃.

3.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

Una vez que la T₃ se encuentra disponible en las neuronas, se dirige al núcleo para unirse a los receptores nucleares de hormonas tiroideas (RHT) e iniciar un mecanismo de regulación de la expresión de genes diana. Los genes *TR α* y *TR β* codifican los receptores TR α 1, TR α 2, y TR β 1 y TR β 2, respectivamente. Estos corresponden a factores de transcripción regulados por ligando, que varían en su capacidad de unión a T₃ y en su distribución tisular (96,97).

La distribución y función de los RHT TR α 1, TR β 1 y TR β 2 han sido ampliamente caracterizadas en el cerebro adulto de roedores. TR α 1 constituye cerca del 70% del total de RHT (98) y se localiza principalmente en neuronas de la sustancia gris, incluyendo neocorteza, hipocampo, cuerpo estriado, cerebelo e hipotálamo (99). En contraste, TR β 1 muestra una expresión menos abundante, pero con un patrón más difuso en todo el cerebro (100). Por su parte, TR β 2 se restringe en gran medida al hipotálamo (101,102) y la hipófisis anterior (103,104), donde participa en la retroalimentación negativa del eje HPT (105,106). Por otro lado, los RHT están altamente expresados en neuronas del hipocampo y del prosencéfalo basal (107), y se ha demostrado que estas hormonas regulan la neurogénesis en el giro dentado durante la etapa adulta (108).

Los RHT ejercen sus funciones tanto como aporreceptor, es decir, en ausencia de su ligando; como holoreceptor, es decir, como un complejo ligando-receptor. En ausencia de T₃, los RHT reclutan correpresores transcripcionales como N-CoR o SMRT, los que compactan la cromatina, reprimiendo la transcripción del gen objetivo. Por otro lado, la T₃ al interactuar con sus receptores nucleares, disocia estos complejos represores y se unen al ADN en regiones específicas denominadas elementos de respuesta a T₃ (TRE), para luego reclutar coactivadores transcripcionales como Trip1 o SRC-1, los que acetilan la cromatina, promoviendo así la transcripción de genes diana (71,109–111).

Se estima que la T₃ regula positiva (induce o aumenta) o negativamente (inhibe o disminuye) en la expresión de entre 500 y 1,000 genes en el sistema nervioso (72,112). Uno de los genes regulados por T₃ y más estudiado es *Hairless (Hr)*. Esta es una proteína dedos de zinc, y la expresión de su gen depende del ciclo del pelo. Además de expresarse en la piel y folículos pilosos, la proteína HR también se expresa en cantidades significativas en el cerebro (111,113). En esta área, HR actúa como un correpresor, facilitando la represión transcripcional por parte de los RHT como aporreceptores (114). El gen *Hr* contiene TRE, por lo tanto, es rápidamente afectado ante la acción de esta hormona, lo que señala que *Hr* es un mediador clave de las HT en el cerebro y que es un buen indicador de la acción de estas hormonas (111). Se ha demostrado que, en condiciones de hipotiroidismo, la reducción de la señalización de T₃ en el cerebro conduce a una disminución de la expresión de genes regulados positivamente, como *Hr* y *Kcnj10*; y a un aumento de la expresión de genes regulados negativamente, como *Etnppl* y *Hmgcs* (115,116). Estos genes, al ser sensibles a las concentraciones de T₃, son indicadores del contenido intracelular de HT.

3.6 DISFUNCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

La mayoría de los genes regulados por T₃ se expresan y regulan principalmente desde el nacimiento hasta las seis semanas postparto, aunque la T₃ también ejerce efectos en el cerebro adulto. La T₃ ha sido descrita como reguladora de procesos como la mielinización, neurogénesis, sinaptogénesis, diferenciación neuronal, migración celular, ramificación de neuritas, citoesqueleto y ritmos circadianos, entre otros (71).

Las alteraciones en los niveles de HT pueden tener efectos profundos en el sistema nervioso central, tanto durante el neurodesarrollo como en la adultez. Durante el desarrollo, un déficit de HT puede causar daños estructurales y fisiológicos irreversibles (110), los cuales se han asociado con enfermedades del neurodesarrollo como autismo, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, epilepsia y esquizofrenia (117). Un ejemplo de las consecuencias de un déficit de T₃ durante el desarrollo es el Síndrome de Allan-Herndon-Dudley, causado por una mutación en MCT8 y caracterizado por un retraso neuropsicomotor, con alteraciones en la sinaptogénesis, mielinización y diferenciación neuronal (118).

En el adulto, tanto el hipotiroidismo como el hipertiroidismo pueden causar, además de complicaciones metabólicas, trastornos psiquiátricos, neurológicos y deterioro cognitivo. Entre las manifestaciones reportadas se incluyen disforia, ansiedad, depresión, inquietud, labilidad emocional y dificultad para concentrarse (119,120). En particular, en pacientes con hipertiroidismo se han descrito alteraciones del ánimo, irritabilidad, ira, depresión, ansiedad, agotamiento, inhibición e incluso insomnio (121,122). Por otro lado, en el hipotiroidismo se han observado alteraciones del ánimo, así como deterioro en el aprendizaje, la memoria, la atención, la fluidez verbal, las habilidades visoespaciales y la velocidad motora (123–125). Finalmente, en casos de hipotiroidismo severo, un síntoma característico es la demencia (126).

En consecuencia, es fundamental mantener niveles normales de HT para asegurar la formación, maduración y mantenimiento de un funcionamiento óptimo del sistema nervioso(127).

Finalmente, es importante mencionar que el hipotiroidismo e hipertiroidismo, junto con sus complicaciones, pueden ser manejadas con el tratamiento adecuado. En el caso del hipotiroidismo, se administra T₄ para restaurar los niveles de hormona T₄ y T₃ en los tejidos (128). Para el hipertiroidismo, se utilizan fármacos como el metimazol y propiltiouracilo para reducir la producción excesiva de HT en la glándula tiroides (129).

3.7 HORMONAS TIROIDEAS Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Numerosos estudios recientes han propuesto una asociación entre la EA y una disfunción de las HT (130–133). Se han descrito similitudes en las manifestaciones clínicas del hipotiroidismo y la EA, como desorientación, confusión y defectos de memoria, y en casos severos, demencia (134). Además, los cambios histopatológicos observados en el cerebro durante el hipotiroidismo, como la atrofia cortical, el

ensanchamiento de los surcos y espacios del líquido cefalorraquídeo subaracnoideo, son similares a los reportados en pacientes con EA (135,136). Esto ha llevado a la sugerencia de que una disfunción de la tiroides podría ser un factor de riesgo para la EA (137). Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la T₃ regula un amplio conjunto de genes, lo que sugiere que podría existir una desregulación génica mediada por esta hormona en EA. En este contexto, se ha demostrado que la T₃ modula tanto la expresión como el empalme de los transcritos de *Tau* y *APP*, genes clave en la fisiopatología de la EA (138–140). Estos hallazgos refuerzan el papel relevante de las HT en los mecanismos fisiopatológicos asociados a la enfermedad.

Existen diversos estudios clínicos que han investigado el estado de las HT en pacientes con EA. En relación con la TSH, se han reportado tanto niveles bajos (141–144), como altos (145,146) en suero de pacientes con EA en comparación con los controles. Además, se ha encontrado que los sujetos con TSH elevada sin hipotiroidismo, presentan tres a cuatro veces más riesgo de demencia en comparación con aquellos con niveles normales de TSH (145).

En cuanto a los niveles de T₃ y T₄ en pacientes con EA, se han reportado niveles altos de T₄ en suero en contraste con el grupo control (144), así como una asociación entre niveles elevados de T₄ libre y total con un mayor número de ovillos neurofibrilares y placas neuríticas en la corteza cerebral (147). Por otro lado, se han reportado niveles bajos de T₃ y/o T₄ total y libre en suero de pacientes con EA en comparación a los controles (131,132,143).

Aunque estos antecedentes constituyen una evidencia clínica sólida que respalda la asociación entre una disfunción de las HT y la EA, aún no existe consenso respecto a si los niveles sanguíneos de TSH, T₃ y T₄ se encuentran aumentados o disminuidos en la EA. Además, los mecanismos que podrían explicar esta desregulación siguen sin esclarecerse.

Para comprender estas alteraciones periféricas observadas y sus posibles mecanismos, es necesario estudiar de manera integral el eje tiroideo. Esto implica analizar la regulación hormonal a nivel de la hipófisis mediante la evaluación de la producción de TSH; así como estudiar la glándula tiroides para analizar la producción de T₃ y T₄; y finalmente la realizar la medición de los niveles séricos de T₃ y T₄, para estimar la disponibilidad sistémica. No obstante, es importante considerar que los niveles periféricos de HT no reflejan con exactitud el contenido y efectos cerebrales de la T₃, ya que estos están modulados por la expresión de transportadores de HT (ingreso), desyodasas (metabolismo local) y receptores de T₃ (acción), que en conjunto determinan su disponibilidad y acción en el sistema nervioso central.

La evidencia respecto al contenido cerebral de HT en la EA es limitada. Davis et al. (2008) evaluaron T₃ y T₄ en corteza prefrontal post mortem de pacientes con EA, encontrando valores normales en fases iniciales y una reducción de T₃ en estadios avanzados (148).

Finalmente, en base a lo anterior, resulta esencial investigar el contenido cerebral de T₃ y T₄, así como los mecanismos que regulan su entrada y metabolismo en áreas afectadas por la EA, como la corteza cerebral y el hipocampo. Hasta la fecha, no existen estudios que hayan evaluado los transportadores de HT, ni la acción de DIO₂ y DIO₃ en el contexto de la EA. Sin embargo, existe un estudio que analizó la expresión de RHT en cerebros de pacientes con EA, donde se observó menores niveles del ARNm de *THRA* en el hipocampo en comparación con controles (149). Esto sugiere que una menor expresión del ARNm de *THRA* podría resultar en una baja acción de T₃ en el cerebro, contribuyendo a la patogénesis de la EA. Por esta razón, es importante conocer la acción genómica de la T₃ en los RHT en el cerebro afectado por la EA.

En resumen, para el planteamiento de la hipótesis y objetivos de esta tesis es necesario recordar lo siguiente:

Diversos estudios han vinculado la disfunción tiroidea con la EA, incluyendo similitudes clínicas e histopatológicas con el hipotiroidismo, alteraciones en los niveles periféricos de HT, TSH y TRH, cambios en la expresión de RHT en el cerebro y en la expresión de genes dependientes de T₃ claves en la EA. Debido a que aún no se tiene claridad de las concentraciones de T₃ y T₄ a nivel periférico y central, y a que no se conocen los mecanismos de disponibilidad (niveles de T₃ y T₄, producción, transporte y metabolismo) y acción de las HT (regulación de genes diana y RHT) en el contexto de la EA, es necesario caracterizar estos aspectos en un modelo animal de la enfermedad.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

¿Cómo son los niveles centrales y periféricos de T₃ y T₄, y sus mecanismos de disponibilidad y acción cerebral en el modelo murino 5XFAD de la EA, en comparación con animales *wild-type*?

La EA presenta una alteración en la disponibilidad de HT, producto de una disfunción en su producción, transporte, metabolismo o receptores, afectando la acción de T₃ en el cerebro en la regulación de la expresión de genes diana.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar los niveles centrales y periféricos de T₃ y T₄, y sus mecanismos de disponibilidad y acción en el cerebro del modelo murino 5XFAD de la EA, en comparación con animales *wild-type*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las concentraciones periféricas de T₃ y T₄ en plasma de ratones 5XFAD y controles *wild-type*.
2. Caracterizar el funcionamiento del eje hipófisis-tiroides en la regulación y producción de T₃ y T₄ en ratones 5XFAD y controles *wild-type*.
3. Determinar el contenido cerebral de T₃ y T₄ en hipocampo y corteza cerebral de ratones 5XFAD y controles *wild-type*.
4. Determinar la expresión de la proteína transportadora MCT8 en la BHE de ratones 5XFAD y *wild-type*.
5. Determinar la expresión del ARNm de las desyodasas *Dio2* y *Dio3* en hipocampo y corteza cerebral de ratones 5XFAD y *wild-type*.
6. Determinar la expresión del ARNm del gen dependiente de T₃ *Hr* y los RHT *TRα* y *TRβ* en hipocampo y corteza cerebral de ratones 5XFAD y *wild-type*.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

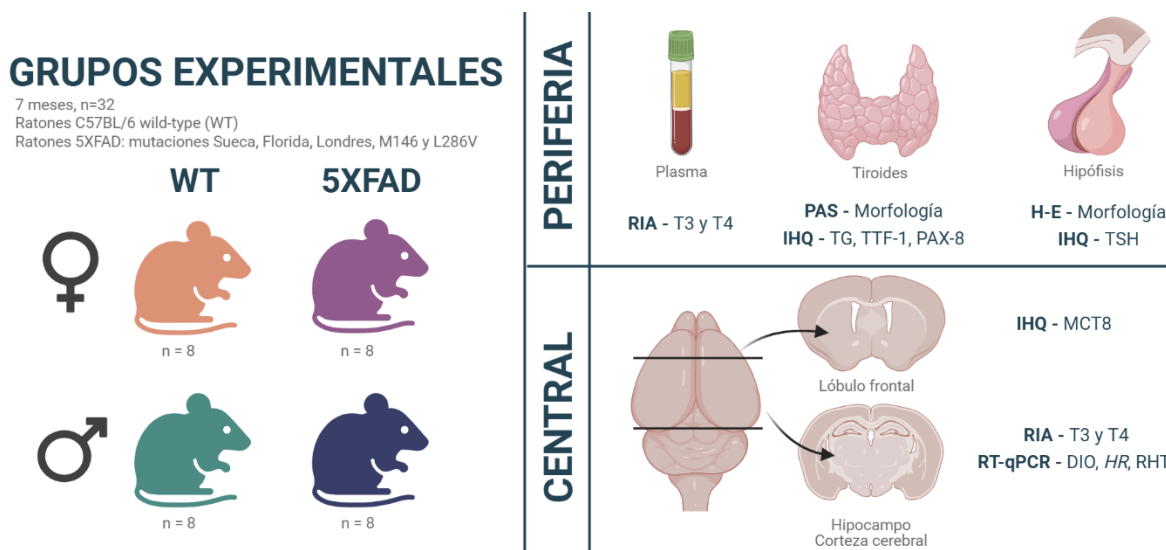


Figura 1. Diseño experimental. Se detallan los grupos experimentales y tamaño muestral (izquierda), así como los experimentos realizados a nivel periférico y del sistema nervioso (derecha).

Se utilizaron 16 ratones 5XFAD y 16 controles C57BL/6J, de ambos sexos y 7 meses de edad. El estudio se dividió en análisis periféricos y centrales. Para los primeros, se extrajo plasma para medir T3 y T4 por radioinmunoensayo (RIA). Asimismo, se recolectaron glándulas tiroides e hipófisis para evaluar morfología mediante la técnica de ácido peryódico de Schiff (PAS) e inmunohistoquímica (IHQ) para TG, TTF-1 y PAX8 en tiroides, y TSH en hipófisis. En cuanto a los estudios centrales, se utilizó el lóbulo frontal para cuantificar el transportador MCT8 en vasos sanguíneos corticales por inmunohistoquímica, y se diseccionaron hipocampo y corteza para determinar T3 y T4 por RIA y para evaluar la expresión de los genes *Dio2*, *Dio3*, *Hr*, *Thra1* y *Thrb1* mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR) (Figura 1).

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación se inició en marzo del año 2024, durante una estancia en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Sols-Morreale (IIBM), Madrid, España. Durante el mes de marzo se realizó la eutanasia de los animales de experimentación, extracción de sangre, tiroides y cerebro, la disección de la corteza cerebral, hipocampo e hipófisis, así como su procesamiento histológico hasta su inclusión en bloques de parafina. Además, se realizaron los experimentos de RIA en colaboración con el equipo de IIBM. Los experimentos morfológicos y de inmunohistoquímica se realizaron en el Laboratorio de Neuroendocrinología, mientras que las RT-qPCR en el Laboratorio de Biología Molecular, ambos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

7.1 ANIMALES

Todos los animales de este proyecto fueron obtenidos de The Jackson Laboratory, EE.UU. a través de Charles River Laboratories, Francia y mantenidos en el animalario del IIBM, Madrid, España.

Los animales estuvieron en condiciones de agua y comida *ad libitum*, ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, y una temperatura de 22°C. Todos los experimentos fueron realizados en 16 ratones 5XFAD (B6.Cg-Tg(APPswFLon,PSEN1*M146L*L286V)6799Vas/Mmjax), y 16 ratones controles C57BL/6J (*wild-type*, WT) (8 hembras y 8 machos en cada grupo) adultos de 7 meses de edad. Los ratones 5XFAD fueron generados y donados a The Jackson Laboratory por el laboratorio de Robert Vassar, Northwestern University (30).

El manejo y utilización de animales de experimentación para este proyecto fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Valparaíso (CICUAL UV) (acta de aprobación BEA193-23), y por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Alimentación de la Comunidad de Madrid (código de registro ES280790000188) (**Anexo 1**). Por otro lado, la aplicación de las medidas de bioseguridad correspondientes en el protocolo experimental fue certificado por el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso, acta de aprobación BS05-23 (**Anexo 2**).

7.2 EUTANASIA Y PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de 1 ml de Ketamina (100 mg/ml) y 0,2 ml de Metedomidina hidrocloreto (1 mg/ml).

Se obtuvo sangre procedente de la cavidad orbitaria de los animales, la cual fue almacenada en un tubo con heparina de litio de 0,5 ml. Posteriormente, los animales fueron perfundidos con 20 ml de Buffer Fosfato Salino 0,01M autoclavado. Con la ayuda de una lupa estereoscópica, se extrajo la tráquea junto con la glándula tiroides. Finalmente, se extrajo el cerebro, el que fue pesado antes de ser diseccionado, para obtener muestras de lóbulo frontal, corteza cerebral, hipocampo e hipófisis.

7.3 RADIOINMUNOENSAYO

Con el objetivo de determinar la disponibilidad periférica y cerebral de HT, se cuantificaron las concentraciones de T₃ y T₄ en el plasma sanguíneo, corteza cerebral e hipocampo de ratones mediante RIA.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos para la obtención del plasma. El hipocampo y la corteza fueron congelados, pesados en seco y homogeneizados con un politrón.

Se sintetizaron [¹²⁵I]-T₃ y [¹²⁵I]-T₄ de alta actividad específica (3000 µCi/µg) mediante yodación de (3-5)-T₂ (Sigma, D0629) y L-T₃ (Sigma, T2877) con [¹²⁵I] (Perkin Elmer, NEZ033A), siguiendo el método de Morreale de Escobar et al. (1985) (150) y sus actualizaciones posteriores (151,152). Brevemente, T₃ y T₄ fueron

extraídos de 80 μ L de plasma usando metanol (1:6), evaporados hasta sequedad y reconstituidos en buffer de RIA. Para cortezas hemiserebrales e hipocampos agrupados (dos por muestra), las hormonas fueron extraídas con metanol-cloroformo, y la fase acuosa fue re-extraída con CaCl_2 al 0,05%. Los extractos fueron posteriormente purificados y eluidos en ácido acético al 70% mediante columnas de intercambio iónico DOWEX AG 1-X2 (Bio-Rad, 140–1251). Las tasas de recuperación se determinaron añadiendo trazas de [^{125}I]- T_3 y [^{125}I]- T_4 a homogeneizados de tejido antes de la extracción.

Los extractos purificados se cuantificaron mediante un RIA de alta sensibilidad, con rangos de detección de 0,4–50 pg de T_3 y 2,5–320 pg de T_4 por tubo. El coeficiente de variación intraensayo fue de 5%, y la variabilidad interensayo osciló entre 10% y 15%.

7.4 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS

Se realizaron estudios histológicos en muestras de hipófisis y tiroides, con el objetivo de caracterizar el funcionamiento del eje hipófisis-tiroides en la regulación y producción de T_3 y T_4 .

Para esto, las muestras obtenidas fueron fijadas en paraformaldehído 4% durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se realizaron cambios en alcoholes ascendentes y xilol, para finalmente ser embebidos en bloques de parafina.

Se realizaron cortes de 3 micras para hipófisis y 5 micras para tiroides utilizando un micrótopo rotatorio (SRM-200, Sakura). Posteriormente, con el fin de evaluar la histoarquitectura glandular, los cortes fueron desparafinados y rehidratados para realizar la técnica de hematoxilina-eosina para glándula hipófisis, y ácido peryódico de Schiff (PAS) para glándula tiroides. Se obtuvo una microfotografía representativa de cada glándula y animal estudiado, en hipófisis a 4x, y en tiroides a 4X, 10X y 40X.

En la hipófisis, se cuantificó el área promedio de los lóbulos de la adenohipófisis. En la tiroides, se cuantificó el área promedio de los lóbulos, el número total de folículos tiroideos, el área promedio de los folículos, y la altura celular. Adicionalmente, se calculó un índice de reabsorción, definido como la relación entre el número total de folículos y la cantidad de folículos que presentaban zonas de reabsorción, las cuales fueron contabilizadas manualmente mediante inspección microscópica.

7.5 INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica en muestras de hipófisis y tiroides con el objetivo de evaluar la regulación y producción de T_3 y T_4 ; y en muestras de lóbulo frontal, con el objetivo de describir la expresión del transportador de HT MCT8 en la BHE.

El procedimiento consistió en desparafinar los cortes de hipófisis y tiroides, rehidratarlos y realizar una recuperación antigénica en buffer citrato pH 6 en olla a presión por 33 minutos, para posteriormente

dejarlos enfriar durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Los cortes fueron tratados con peróxido de hidrógeno al 3% en agua destilada por 30 minutos en agitación, para bloquear la peroxidasa endógena, seguido de un bloqueo de sitios inespecíficos con una solución de suero de cabra 5%, Tritón X-100 0,1% y suero de albúmina bovina 4%, posteriormente con CAS-Block (008120, Invitrogen), ambos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los tejidos fueron incubados con los anticuerpos primarios correspondientes a las diluciones óptimas. Para la hipófisis, se utilizó el anticuerpo TSHbeta (BS-2676R, Bioss, 1:500) para identificar y analizar las células tirotropas de la adenohipófisis. Para la tiroides, se utilizó TG (sc-365997, Santa Cruz Biotechnology, 1:100), TTF-1 (sc-53136, Santa Cruz Biotechnology, 1:100) y PAX-8 (sc-81353, Santa Cruz Biotechnology, 1:100), para estudiar el proceso de producción de T₃ y T₄. Para el lóbulo frontal, se aplicó MCT8 (HPA072719, Sigma-Aldrich, 1:100) para caracterizar la expresión del transportador de HT en la BHE de la corteza cerebral. Luego del anticuerpo primario, se incubó con los anticuerpos secundarios (BSB0203, BioSB; 11103500, Jackson ImmunoResearch, 1:500 (TSHbeta), 1:250 (MCT8); SAB3701073, 1:250 (TTF-1, PAX-8, TG) y se reveló utilizando diaminobencidina (D5637, Sigma-Aldrich, 0.5 mg/mL) para visualizar el marcaje inmunohistoquímico.

Para el análisis de la hipófisis, se capturó una microfotografía representativa de la adenohipófisis por cada animal, con un aumento de 40x. Se cuantificaron la intensidad y el área promedio de inmunomarcaje en el citoplasma de las células tirotropas.

En el caso de la tiroides, se obtuvo una microfotografía representativa por cada lóbulo del animal a 40x, y se cuantificó la intensidad promedio de inmunomarcaje en diferentes regiones según el anticuerpo empleado: los núcleos de las células foliculares con PAX-8 y TTF-1, y el coloide con TG. Para PAX-8 y TTF-1, se seleccionó una imagen representativa por animal y se midió la intensidad promedio de inmunomarcaje. En el caso de la TG, se evaluó de manera semi-cuantitativa el patrón y la intensidad del marcaje en una escala de tres niveles: leve (+), moderada (++) e intensa (+++), tomando en cuenta el color observado en el borde apical. Esta evaluación fue realizada de forma independiente por dos observadores a un aumento de 40x.

Finalmente, para el lóbulo frontal, se seleccionó una microfotografía por animal de un vaso sanguíneo representativo en la corteza cerebral, con aumento 40x, y se cuantificó la intensidad promedio de inmunomarcaje en el endotelio vascular.

Para todos análisis morfológicos y de IHQ se utilizó un microscopio óptico Olympus doble observador (Olympus CX43RF), una cámara Motic (Moticam 4000) y el software ImageJ.

7.6 EXTRACCIÓN DE ARN Y PCR CUANTITATIVA CON TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Se aisló ARN total de la corteza cerebral e hipocampo utilizando el kit Quick-RNA™ MiniPrep (Zymo Research, R1054), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN fueron determinadas mediante un fluorómetro Quantus™ (Promega, E6150). A partir de 250 ng de ARN total se sintetizó el ADN complementario (ADNc) utilizando el kit iScript™ ADNc Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, 1708891). Para el análisis cuantitativo, se utilizó una alícuota de ADNc equivalente a 5 ng del ARN total inicial.

La RT-qPCR se realizó utilizando el reactivo SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, 1725274), en un sistema de detección CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Las condiciones del ciclo térmico consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Todas las reacciones se realizaron por triplicado técnico, cuyos valores se promediaron. Se utilizaron los genes GAPDH y ARN ribosomal 18S (18S) como genes de referencia. Los datos se expresan en relación con el promedio de los genes de referencia, como veces de cambio respecto a los valores promedio obtenidos de los machos WT.

Se evaluaron los niveles de expresión de desyodasas *Dio2* y *Dio3*, el gen dependiente de *T3 Hr*, y los RHT *Thra* y *Thrb*, utilizando los siguientes promotores:

Forward *Dio2*: 5'-GTCCGCAAATGACCCCTTT-3'

Reverse *Dio2*: 5'-CCCACCCACTCTCTGACTTTC-3'

Forward *Dio3*: 5'-GTTTTTGGCTTGCTCTCAGG-3'

Reverse *Dio3*: 5'-CAACAAGTCCGAGCTGTGAA-3'

Forward *Hr*: 5'-AGCACTGTGTGGCATGTGTT-3'

Reverse *Hr*: 5'-AACCTGCATCCAAGTAGCA-3'

Forward *Thra*: 5'-CATCTTTGAACTGGGCAAGT-3'

Reverse *Thra*: 5'-CTGAGGCTTTAGACTTCCTGATC-3'

Forward *Thrb*: 5'-AACCAAGTCCAGGAATGTGC-3'

Reverse *Thrb*: 5'-CTCTTCTCACGGTTCTCCTC-3'

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Los gráficos se presentan como media \pm error estándar. Los valores atípicos fueron identificados y excluidos mediante el método ROUT (Q=1%). La distribución de los datos fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Dependiendo de la distribución, las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando pruebas paramétricas o no paramétricas. Cuando todos los grupos experimentales cumplieron con los supuestos de normalidad, se utilizó la prueba ANOVA

de dos vías, seguida de la prueba post-hoc de Sidak para comparaciones múltiples, considerando los factores genotipo × sexo × variable de resultado. En los casos en que uno o más grupos no cumplieron con la normalidad, se aplicaron comparaciones múltiples entre grupos individuales mediante pruebas t de Student (si ambos grupos presentaban distribución normal) o Mann–Whitney U (si uno o ambos grupos no presentaban distribución normal), según correspondiera. Para las figuras 2A-B, 3D, 5A, 6C, 12B y 14C, la significancia estadística se evaluó mediante la prueba de t de Student o la prueba de Mann–Whitney, según la distribución de los datos. Para las figuras 3A, 3C, 4A, 5B, 6A-B, 8A, 9A, 10A-D, 11A, 12A, 12C-D, 13A-B, 14A-B y 14D, se realizó un ANOVA de dos vías, seguido de la prueba post-hoc de Sidak.

Las diferencias estadísticamente significativas se indican de la siguiente manera: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****), no significativo (ns). Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron utilizando GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.).

9. RESULTADOS

Los resultados a continuación presentan una organización que sigue las áreas anatómicas y funcionales estudiadas, con un flujo coherente desde los sistemas reguladores periféricos hacia los mecanismos locales en el cerebro, con el fin de facilitar la lectura e interpretación integrada de los hallazgos dentro de cada compartimento fisiológico.

9.1 MENORES NIVELES PLASMÁTICOS DE T₃ Y T₄ EN RATONES MACHO 5XFAD

Con el fin de caracterizar la disponibilidad periférica de HT en el modelo de la EA, se cuantificaron las concentraciones plasmáticas de T₄ y T₃ en ratones 5XFAD y controles.

Los ratones macho 5XFAD presentaron niveles plasmáticos significativamente más bajos de T₄ ($30,29 \pm 7,91$ ng/mL) y T₃ ($383,0 \pm 45,76$ ng/mL) en comparación con sus controles WT (T₄: $42,33 \pm 9,21$ ng/mL; T₃: $474,6 \pm 92,02$ ng/mL). Por el contrario, las hembras 5XFAD no mostraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de T₄ ($49,44 \pm 8,96$ ng/mL) ni de T₃ ($473,4 \pm 124,50$ ng/mL) respecto de las hembras WT (T₄: $58,43 \pm 8,75$ ng/mL; T₃: $507,8 \pm 129,30$ ng/mL) (**Figura 2**).

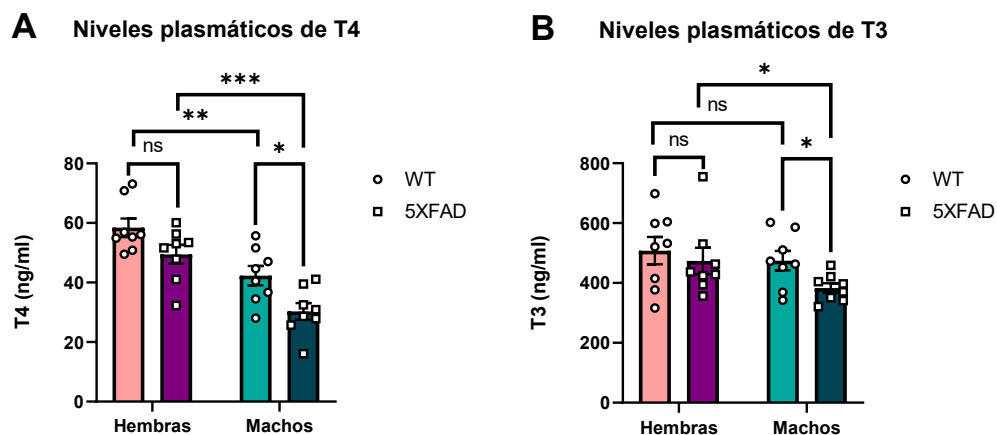


Figura 2. Niveles plasmáticos de T₄ y T₃ en ratones 5XFAD y WT. Niveles plasmáticos de T₄ (A) y T₃ (B) en ratones 5XFAD y WT de ambos sexos. Los ratones 5XFAD machos presentan niveles significativamente menores de T₄ y T₃ en comparación con los machos WT, mientras que no se observan diferencias significativas entre los genotipos femeninos. En ambos paneles, las hembras presentan niveles hormonales más altos que los machos dentro de cada genotipo. ns: no significativo. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. (A, B: n=32).

Al comparar entre sexos, tanto en el grupo WT como en el 5XFAD, las hembras mostraron niveles plasmáticos de T₄ más elevados que los machos (**Figura 2A**). En cuanto a T₃, esta diferencia sexual solo fue evidente en el grupo 5XFAD, donde las hembras presentaron valores más altos que los machos (**Figura 2B**).

En conjunto, estos resultados evidencian una alteración dependiente del sexo en los niveles periféricos de HT en el modelo 5XFAD, dado a que únicamente los machos presentan un perfil de hipotiroidismo periférico.

9.2 ALTERACIONES SEXO-DEPENDIENTES EN LA MORFOLOGÍA HIPOFISIARIA Y EXPRESIÓN DE TSH EN RATONES 5XFAD

Dado que se observaron menores niveles plasmáticos de T₃ y T₄ en ratones macho 5XFAD, se evaluó el estado funcional del eje hipófisis-tiroides. Para ello, se caracterizó la morfología de la adenohipófisis y se analizaron parámetros relacionados con la producción de TSH (**Figura 3**), una hormona clave en la regulación del eje y marcador de la actividad funcional de las células tirotropas.

El análisis morfométrico de la glándula adenohipófisis no evidenció diferencias significativas en el área lobular promedio entre hembras WT ($1,21 \pm 0,17 \text{ mm}^2$) y 5XFAD ($1,12 \pm 0,22 \text{ mm}^2$). En cambio, los machos 5XFAD mostraron un mayor tamaño glandular ($1,13 \pm 0,26 \text{ mm}^2$) en comparación con sus controles ($0,91 \pm 0,12 \text{ mm}^2$). Al analizar las variables según sexo, es interesante notar que las hembras WT mostraron un área glandular significativamente mayor que los machos WT (**Figura 3A, B**).

Para estudiar la producción de TSH, se cuantificó el área promedio de las células tirotropas. No se observaron diferencias significativas entre genotipos, tanto en hembras (WT: $82,20 \pm 20,67 \mu\text{m}^2$; 5XFAD: $71,25 \pm 29,7 \mu\text{m}^2$) como en machos (WT: $68,63 \pm 12,53 \mu\text{m}^2$; 5XFAD: $75,62 \pm 22,25 \mu\text{m}^2$) (**Figura 3C, E-H**). No obstante, al analizar la expresión de TSH mediante inmunotinción, se observó que las hembras 5XFAD ($201,8 \pm 23,05$) presentaron una menor intensidad promedio que las hembras WT ($218,4 \pm 6,01$), mientras que los machos no presentaron cambios entre los genotipos estudiados (WT: $220,3 \pm 11,75$; 5XFAD: $211,5 \pm 9,20$) (**Figura 3D, E-H**).

En conjunto, estos hallazgos sugieren una alteración sexo-dependiente en la actividad del eje hipófisis-tiroides en el modelo 5XFAD, evidenciada por cambios morfológicos y expresión de TSH en la hipófisis.

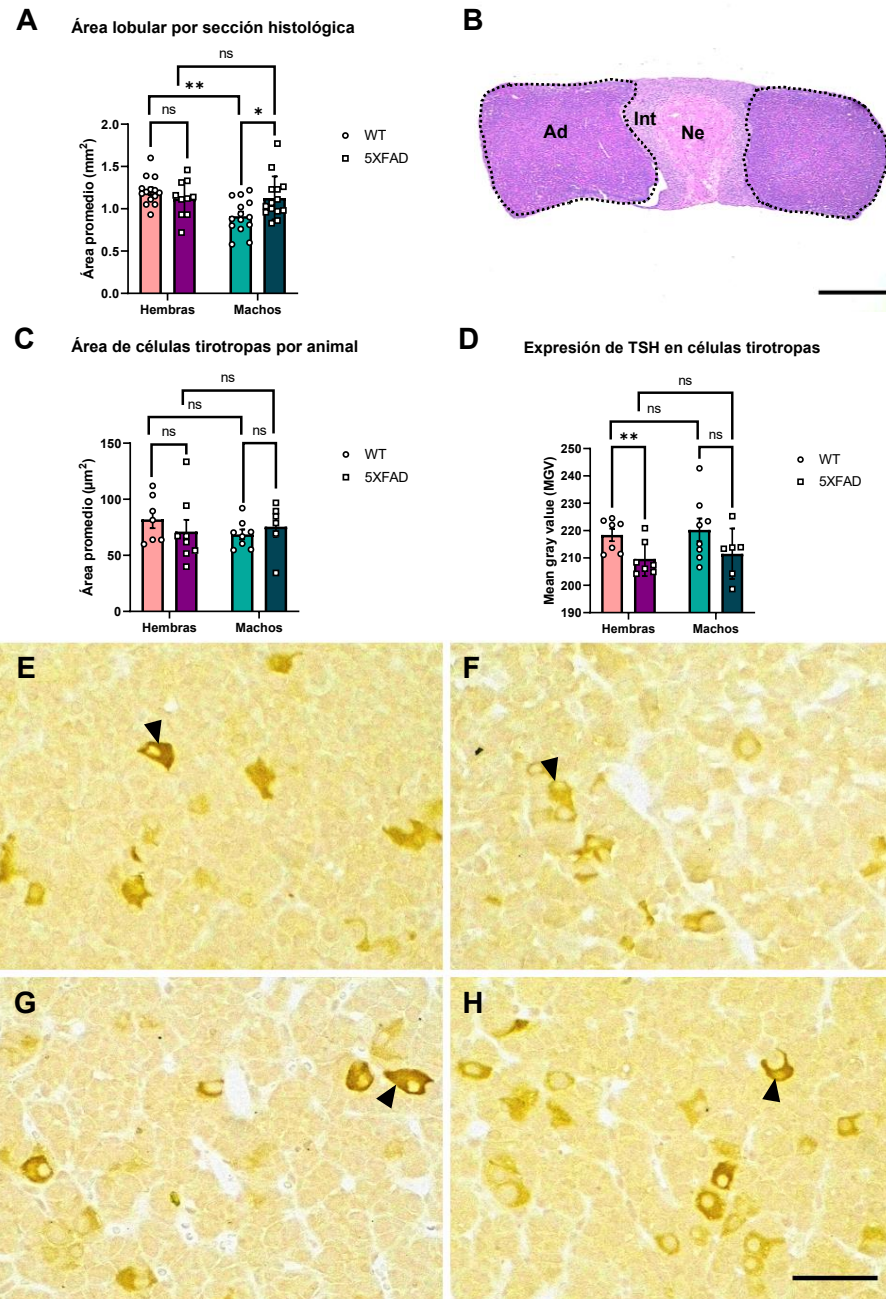


Figura 3. Caracterización morfológica e inmunohistoquímica de adenohipófisis de ratones WT y 5XFAD de ambos sexos. Área lobular promedio por sección histológica (**A**) Se observa una mayor área lobular en los machos 5XFAD en comparación con sus controles. En cambio, las hembras 5XFAD no presentan diferencias significativas respecto a sus contrapartes WT. Imagen representativa de una sección de hipófisis teñida con hematoxilina-eosina (**B**). Área promedio de células tirotropas (TSH+) por animal (**C**). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos. Expresión de TSH evaluada como intensidad promedio de señal (*mean gray value*, MGv) en células tirotropas (**D**) Las hembras 5XFAD presentan una menor señal de TSH en comparación con las hembras WT. No se observan diferencias significativas entre machos. Imágenes representativas de inmunohistoquímica para TSH en hipófisis de: (**E**) Hembra WT, (**F**) Hembra 5XFAD, (**G**) Macho WT y (**H**) Macho 5XFAD. La punta de flecha (▼) indica células TSH+. La barra en (**B**) representa 500 micras y en (**H**) 50 micras. Ad: adenohipófisis (delimitada con línea punteada), Int: porción intermedia, Neu: neurohipófisis, ns: no significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (A: $n=26$; C, D: $n=29$).

9.3 ALTERACIONES SEXO-DEPENDIENTES EN LA MORFOLOGÍA DE LA GLÁNDULA TIROIDES EN RATONES 5XFAD

Dado que se observaron alteraciones sexo-dependientes en la morfología y expresión de TSH de la hipófisis anterior, se evaluó la glándula tiroides como siguiente eslabón del eje hormonal. El análisis comenzó con una caracterización morfométrica de los lóbulos tiroideos (**Figura 4**), avanzando progresivamente hacia componentes estructurales y funcionales, que corresponden a los folículos (**Figura 5**), las células foliculares y las zonas de reabsorción (**Figura 6**), con el objetivo de determinar si los cambios observados a nivel hipofisario se reflejan en la estructura de la tiroides.

El análisis del área promedio lobular no evidenció diferencias significativas entre hembras 5XFAD ($0,37 \pm 0,10 \text{ mm}^2$) y sus controles WT ($0,40 \pm 0,08 \text{ mm}^2$) (**Figura 4A, B, C**). De forma distinta, los machos 5XFAD ($0,46 \pm 0,10 \text{ mm}^2$) presentaron un mayor tamaño lobular en comparación con los machos WT ($0,34 \pm 0,02 \text{ mm}^2$) (**Figura 4A, D, E**). Al comparar entre sexos, los machos 5XFAD mostraron lóbulos tiroideos de mayor área que las hembras del mismo genotipo (**Figura 4A, C, E**).

A Área lobular por sección histológica

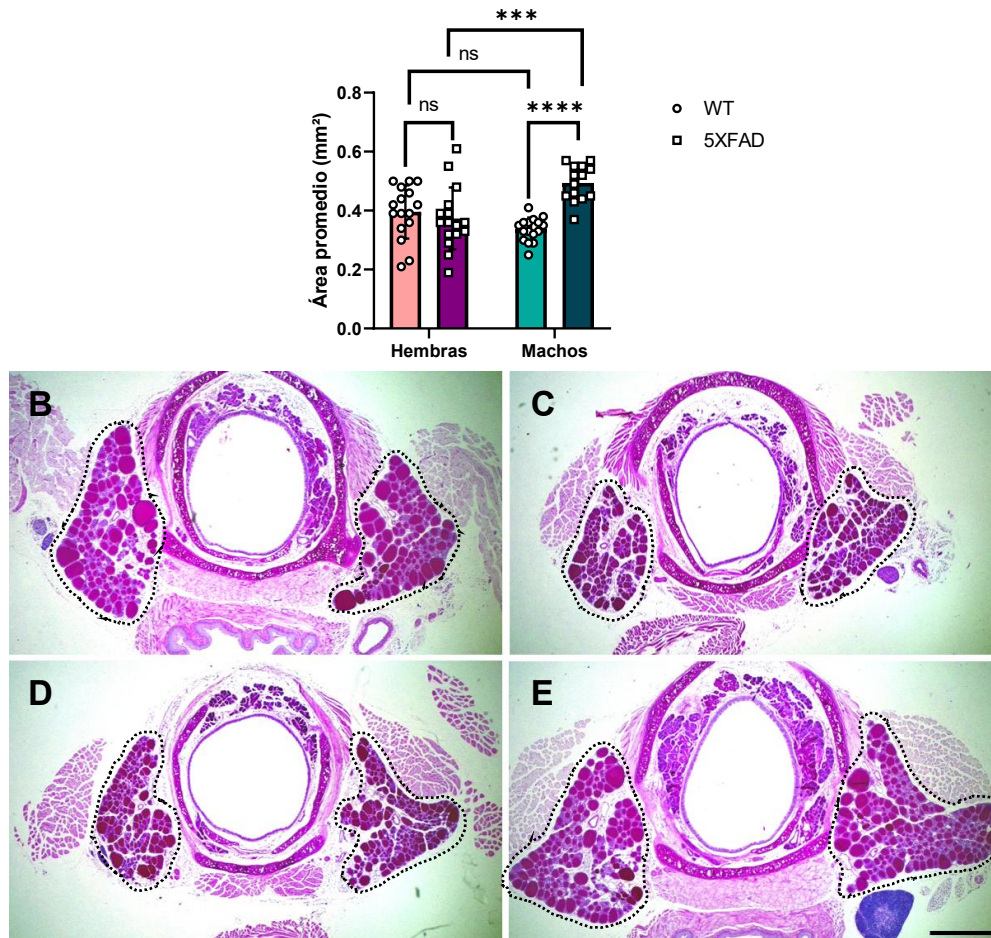


Figura 4. Análisis morfométrico arquitectura lobular tiroidea de ratones WT y 5XFAD de ambos sexos. Área lobular promedio por sección histológica (A). Los machos 5XFAD presentan mayor área lobular promedio en comparación con los machos WT, mientras que las hembras no muestran diferencias significativas. Imágenes representativas de secciones de glándula tiroides (línea punteada) teñidas con PAS de: (B) Hembra WT, (C) Hembra 5XFAD, (D) Macho WT y (E) Macho 5XFAD. La barra en (E) representa 500 micras. ns: no significativo; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. (A: n=31).

Para profundizar en los cambios morfológicos, se evaluaron los folículos tiroideos. El número de folículos tiroideos no varió significativamente entre hembras (WT: 339,5 ± 65,67; 5XFAD: 345,4 ± 75,62) ni machos (WT: 323,4 ± 59,05; 5XFAD: 303 ± 69,06) de ambos genotipos (Figura 5A, C-F). Sin embargo, al analizar el área promedio folicular, se observó que hembras 5XFAD (1,774 ± 0,22 mm²) presentaban folículos de menor tamaño que sus controles (2,13 ± 0,41 mm²) (Figura 5B, C, D). De manera opuesta, los machos 5XFAD (2,40 ± 0,28 mm²) mostraron folículos de mayor tamaño que su contraparte WT (1,70 ± 0,22 mm²) (Figura 5B, E, F). Entre sexos, se observó que los folículos de hembras WT superaban en tamaño a los de machos WT; mientras que los machos 5XFAD exhibían folículos de mayor tamaño que hembras del mismo genotipo (Figura 5B, C-F).

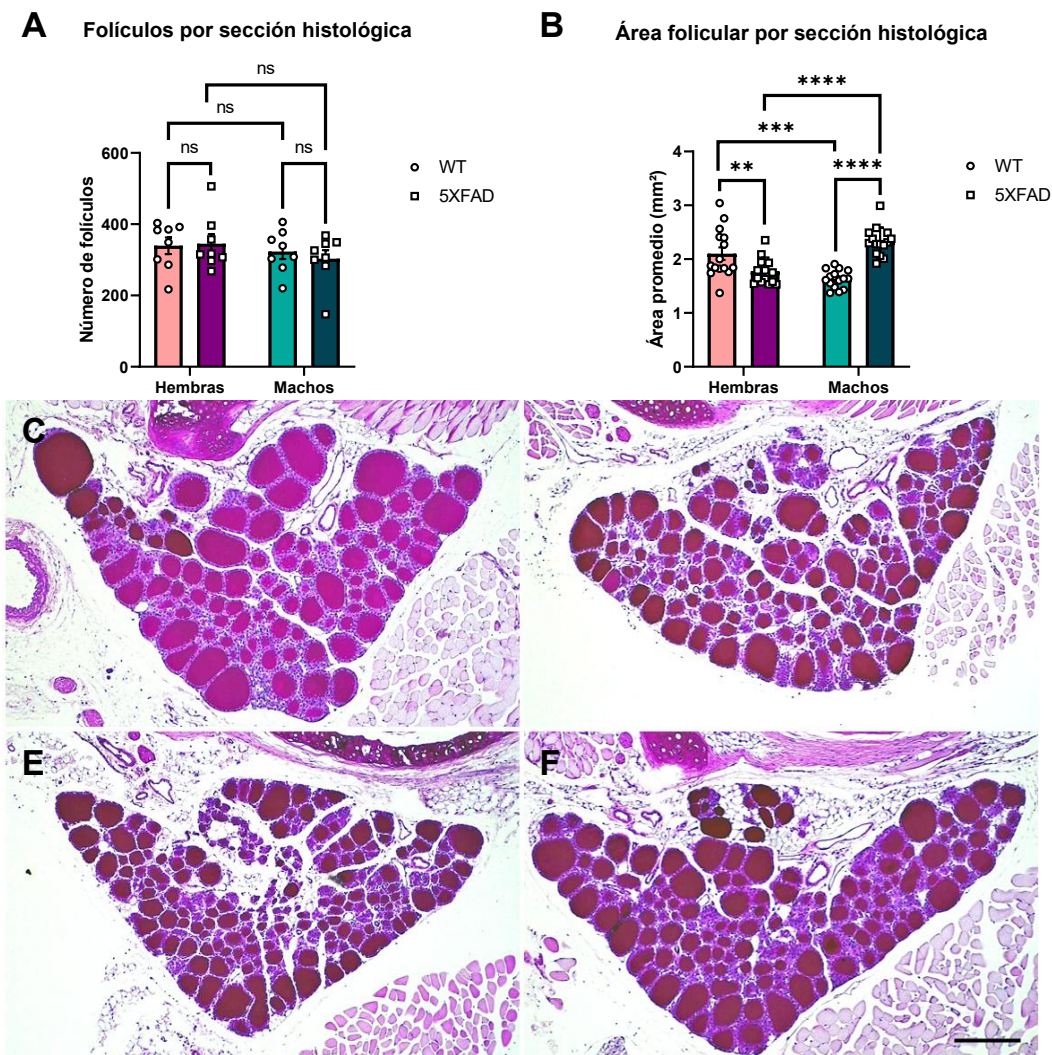


Figura 5. Análisis morfométrico de folículos tiroideos de ratones WT y 5XFAD de ambos sexos. Número de folículos por sección histológica (A). No se observan diferencias significativas entre los grupos analizados. Área folicular promedio por sección histológica (B). Se evidencian valores significativamente más altos en machos 5XFAD en relación con su contraparte WT. Al contrario, las hembras 5XFAD muestran menor área folicular promedio que sus controles WT. Imágenes representativas de secciones de glándula tiroides teñidas con PAS de: (C) Hembra WT, (D) Hembra 5XFAD, (E) Macho WT y (F) Macho 5XFAD. La barra en (F) representa 200 micras. ns: no significativo; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. (A, B: n=32).

A continuación, se analizó la morfología de los tirocitos para caracterizar con mayor detalle la glándula. La altura de las células foliculares fue menor en hembras 5XFAD ($5,99 \pm 0,41 \mu\text{m}$) que en hembras WT ($7,46 \pm 0,86 \mu\text{m}$), mientras que los machos 5XFAD ($8,74 \pm 0,31 \mu\text{m}$) presentaron tirocitos de mayor altura que los machos WT ($5,53 \pm 0,57 \mu\text{m}$) (Figura 6A, D-G). De forma similar, el área nuclear promedio de los tirocitos fue inferior en hembras 5XFAD ($15,75 \pm 1,96 \mu\text{m}^2$) que en su contraparte WT ($21,25 \pm 2,44 \mu\text{m}^2$); en cambio, los machos 5XFAD ($21,67 \pm 1,6 \mu\text{m}^2$) mostraron núcleos de mayor tamaño que sus controles WT ($17,67 \pm 2,00 \mu\text{m}^2$) (Figura 6B, D-G). Al analizar ambas variables según sexo, se observó que los machos WT presentaron tirocitos más pequeños que las hembras WT, mientras que en el grupo 5XFAD, los machos exhibieron tirocitos más grandes que las hembras (Figura 6A, B).

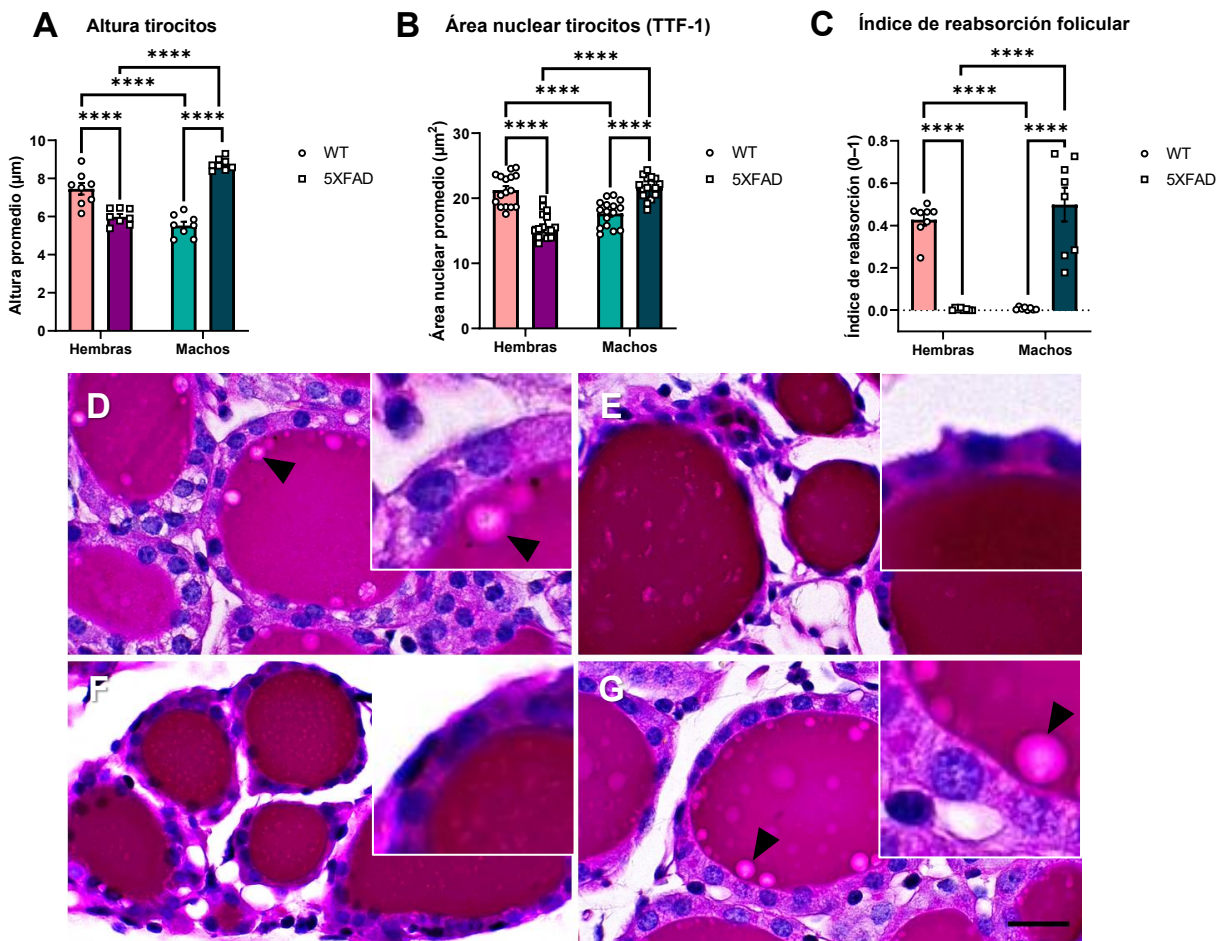


Figura 6. Análisis morfológico de tirocitos y zonas de reabsorción de ratones WT y 5XFAD de ambos sexos. Altura promedio de tirocitos (A). Los machos 5XFAD presentan una mayor altura de tirocitos en comparación con los machos WT, mientras que las hembras 5XFAD exhiben una menor altura en relación con sus contrapartes WT. Área nuclear promedio de tirocitos (B). Se observa el mismo patrón que en la altura celular: los machos 5XFAD muestran una mayor área nuclear promedio respecto a los WT, mientras que las hembras 5XFAD presentan núcleos más pequeños en comparación con sus controles. Índice de reabsorción tiroideo (C). Los machos 5XFAD presentan un mayor índice de reabsorción en comparación con los machos WT, mientras que las hembras 5XFAD muestran un índice menor respecto a sus contrapartes WT. Imágenes representativas de secciones de glándula tiroides teñidas con PAS de: (C) Hembra WT, (D) Hembra 5XFAD, (E) Macho WT y (F) Macho 5XFAD. Las puntas de flecha (▼) indican las zonas de reabsorción en los folículos. La barra en (G) representa 20 micras. ***p < 0,001; ****p < 0,0001. (A-C: n=32).

Finalmente, con el objetivo de evaluar el estado morfofuncional de la glándula tiroides, se cuantificaron las zonas de reabsorción presentes en el coloide de los folículos tiroideos, estructuras que reflejan la actividad secretora de los tirocitos. A partir de este análisis, se calculó un índice de reabsorción tiroidea, el cual definimos como la proporción entre el número de folículos que presentaban zonas de reabsorción y el total de folículos analizados en cada muestra.

El índice de reabsorción tiroidea fue de un 43% en hembras WT ($0,43 \pm 0,08$), mientras que las hembras 5XFAD ($0,004 \pm 0,005$) presentaron 0,4% (**Figura 6C, D, E**). Por el contrario, los machos 5XFAD ($0,50 \pm 0,23$) mostraron un valor de 50%, muy superior al 0,7% observado en los machos WT ($0,007 \pm 0,006$) (**Figura 6C, F, G**). Notablemente, al comparar por sexos, los machos WT prácticamente no presentaron zonas de reabsorción, en contraste con la abundante presencia observada en hembras WT (**Figura 6C, D, F**). En cambio, hembras 5XFAD exhibieron escasas áreas de reabsorción en comparación con las numerosas áreas observadas en los machos 5XFAD (**Figura 6C, E, G**).

En su totalidad, estas observaciones evidencian un estado morfofuncional alterado de la glándula tiroides en el modelo 5XFAD, con un perfil que varía según el sexo. En hembras 5XFAD, la morfología glandular sugiere una tiroides hipoactiva, con signos compatibles con atrofia y reducción funcional. En contraste, los machos 5XFAD presentan características asociadas a una tiroides con hipertrofia funcional, lo que sugiere una mayor actividad. Finalmente, los animales WT muestran un dimorfismo sexual en la morfología tiroidea, donde las hembras exhiben una glándula aparentemente más activa que la de los machos.

9.4 EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA FUNCIONALIDAD TIROIDEA EN RATONES 5XFAD

Tras evidenciar alteraciones morfológicas en la glándula tiroides compatibles con modificaciones en su funcionalidad, se procedió a explorar si estos cambios estructurales se acompañaban de variaciones en la expresión de proteínas clave para el mantenimiento de la función tiroidea.

Con este objetivo, se analizó la expresión de TG, una glicoproteína fundamental en la síntesis de T3 y T4, y marcador sensible del estado funcional de los tirocitos. El análisis inmunohistoquímico reveló un patrón de expresión diferenciado entre grupos en el borde apical del epitelio folicular (**Figura 7**).

En hembras WT, se observó una expresión intensa (+++), mientras que en hembras 5XFAD, se evidenció una expresión moderada (++) . Un inmunomarcaje similar se observó en los machos WT (++) . En contraste, los machos 5XFAD mostraron un inmunomarcaje intenso (+++) (**Figura 7A-D**).

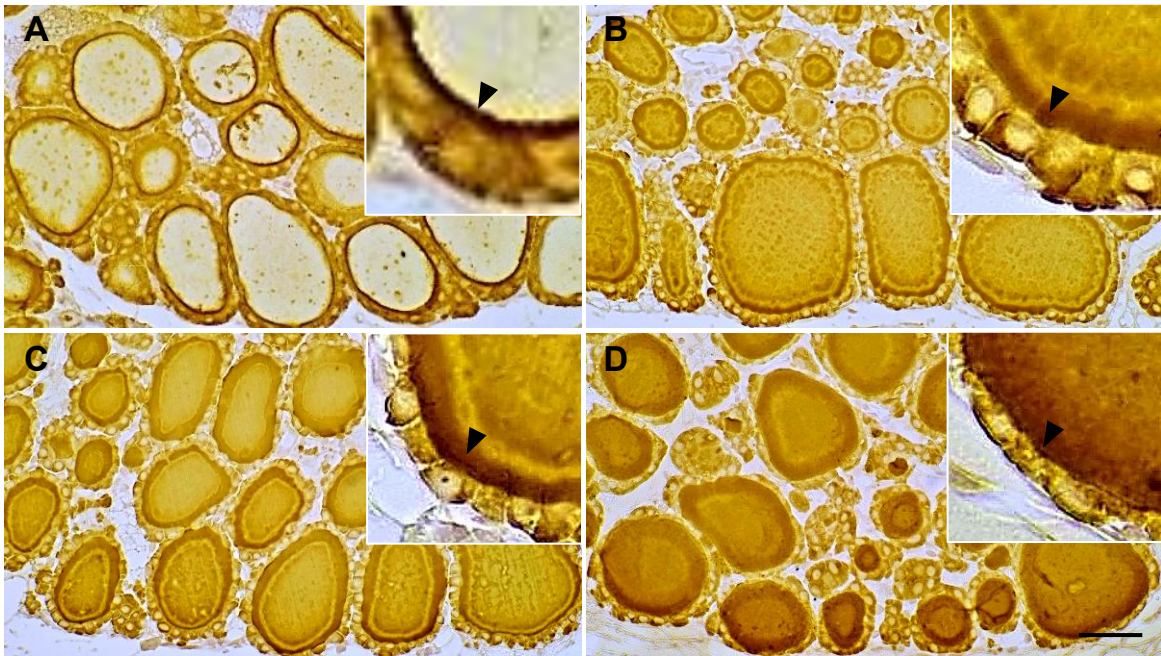


Figura 7. Expresión de tiroglobulina en los folículos tiroideos de animales WT y 5XFAD de ambos sexos. Imágenes representativas de inmunohistoquímica para TG en tiroides (**A**) Hembra WT, (**B**) Hembra 5XFAD, (**C**) Macho WT y (**D**) Macho 5XFAD. Las puntas de flecha (▼) indican el marcaje apical. Se observa una mayor intensidad de marcaje apical en las hembras WT y machos 5XFAD, y una menor intensidad en hembras 5XFAD y machos WT. La barra en (D) representa 50 micras. (n=32).

Complementariamente, se analizó la expresión de dos factores de transcripción en células foliculares, ambos claves para la expresión de genes asociados a la producción de HT, TTF-1 (**Figura 8**) y PAX-8 (**Figura 9**).

El análisis de la intensidad de inmunomarcaje reveló que las hembras 5XFAD ($125 \pm 7,43$) presentaban una menor expresión de TTF-1 en comparación con las hembras WT ($147,3 \pm 6,38$) (**Figura 8A, B, C**). Por otro lado, los machos no presentaron diferencias entre genotipo (WT: $147,5 \pm 12,31$; 5XFAD: $147,5 \pm 8,61$) (**Figura 8A, D, E**). Curiosamente, al comparar entre sexos, no se observaron diferencias significativas en la expresión de TTF-1 en los animales WT. Sin embargo, en el grupo 5XFAD, los machos presentaron una mayor expresión de TTF-1 en comparación con las hembras 5XFAD (**Figura 8A, C, E**).

A Expresión de TTF-1 en tirocitos

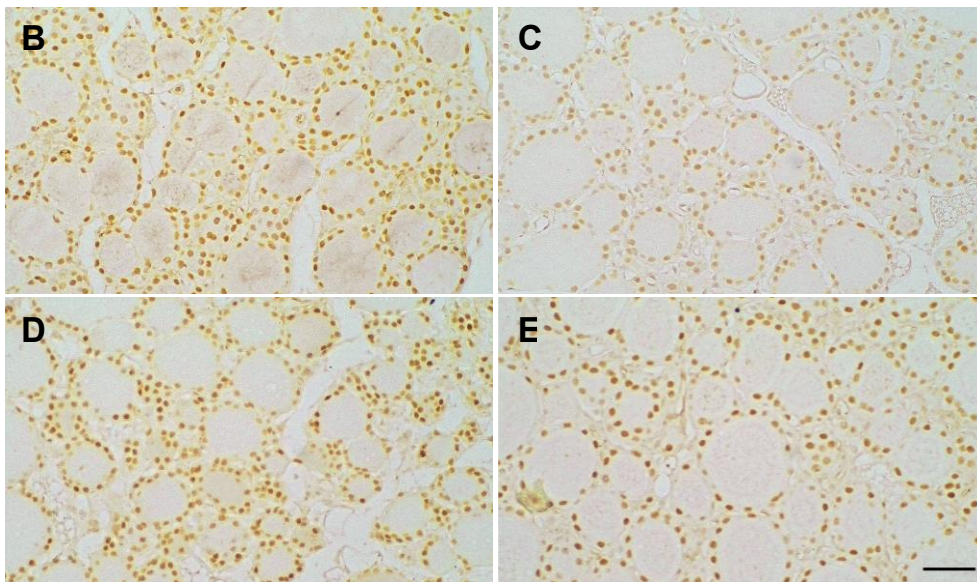
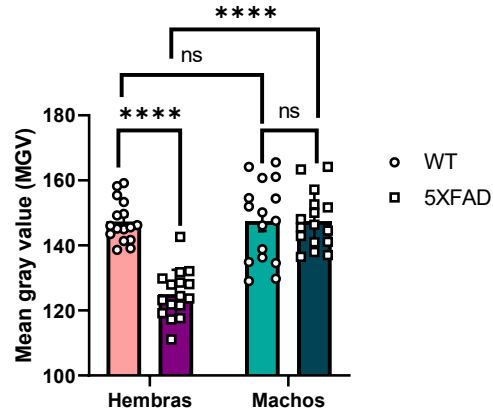


Figura 8. Cuantificación de la expresión de TTF-1 en animales WT y 5XFAD de ambos sexos. Expresión de TTF-1 en tirocitos (A). No se observan diferencias significativas entre machos 5XFAD y WT. Por el contrario, las hembras 5XFAD presentan menor inmunomarcaje que sus controles. Imágenes representativas de inmunohistoquímica para TTF-1 en tiroides (B) Hembra WT, (C) Hembra 5XFAD, (D) Macho WT y (E) Macho 5XFAD. La barra en (E) representa 50 micras. ns: no significativo; ****p < 0,0001. (A: n=32).

Finalmente, en cuanto a la expresión de PAX-8 en tirocitos (Figura 9), la medición de la señal de inmunotinción mostró una menor intensidad en hembras 5XFAD ($153 \pm 10,84$) respecto a sus controles ($169,1 \pm 8,70$) (Figura 9A, B, C). Por el contrario, los machos 5XFAD ($178,4 \pm 9,11$) manifestaron una mayor intensidad que los machos WT ($169,4 \pm 6,80$) (Figura 9A, D, E). De manera interesante, entre sexos no hubo diferencias significativas en animales WT. De manera diferente, los machos 5XFAD evidenciaron una mayor expresión de PAX-8 en relación con hembras 5XFAD (Figura 9A, C, E).

A Expresión de PAX-8 en tirocitos

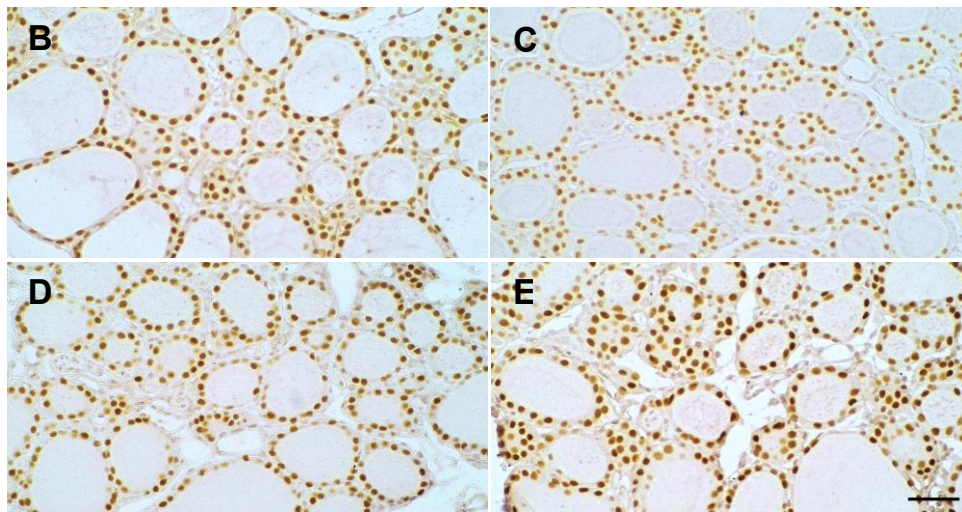
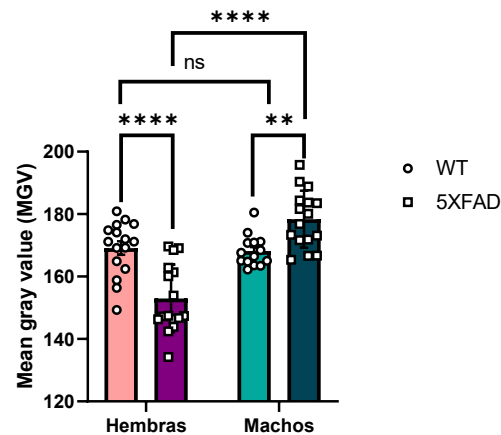


Figura 9. Cuantificación de la expresión de PAX-8 en animales WT y 5XFAD de ambos sexos. Expresión de PAX-8 en tirocitos (A). El inmunomarcaje para PAX-8 es mayor en machos 5XFAD en comparación con los WT, mientras que en las hembras 5XFAD es menor frente a sus controles. Imágenes representativas de inmunohistoquímica para PAX-8 en tirocitos (B) Hembra WT, (C) Hembra 5XFAD, (D) Macho WT y (E) Macho 5XFAD. La barra en (E) representa 50 micras. ns: no significativo; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. (A: $n=32$).

En su totalidad, estos hallazgos profundizan en la caracterización funcional de la tiroides en el modelo 5XFAD, revelando alteraciones en la expresión de proteínas clave para la diferenciación, el mantenimiento y la actividad glandular. Estas modificaciones exhiben un claro componente sexual: las hembras 5XFAD presentan un patrón que sugiere una reducción en la actividad tiroidea. En cambio, los machos 5XFAD exhiben un perfil que apunta a una tiroides hiperfuncionante.

9.5 CONTENIDO NORMAL DE T₃ Y T₄ EN LA CORTEZA CEREBRAL Y EL HIPOCAMPO DE RATONES 5XFAD

Para evaluar si las alteraciones periféricas en los niveles de HT se reflejan también a nivel cerebral, se analizó el contenido de T₄ y T₃ en la corteza cerebral y el hipocampo de los animales.

Las hembras 5XFAD mostraron un contenido de T4 y T3 en corteza cerebral (T4: $8,31 \pm 2,07$ ng/mL; T3: $11,21 \pm 1,13$ ng/mL) e hipocampo (T4: $12,30 \pm 2,40$ ng/mL; T3: $11,10 \pm 0,76$ ng/mL) comparables al observado en sus controles (corteza: T4: $9,79 \pm 1,32$ ng/mL; T3: $11,41 \pm 0,77$ ng/mL; hipocampo: T4: $13,57 \pm 2,11$ ng/mL; T3: $10,66 \pm 1,19$ ng/mL) (**Figura 10**).

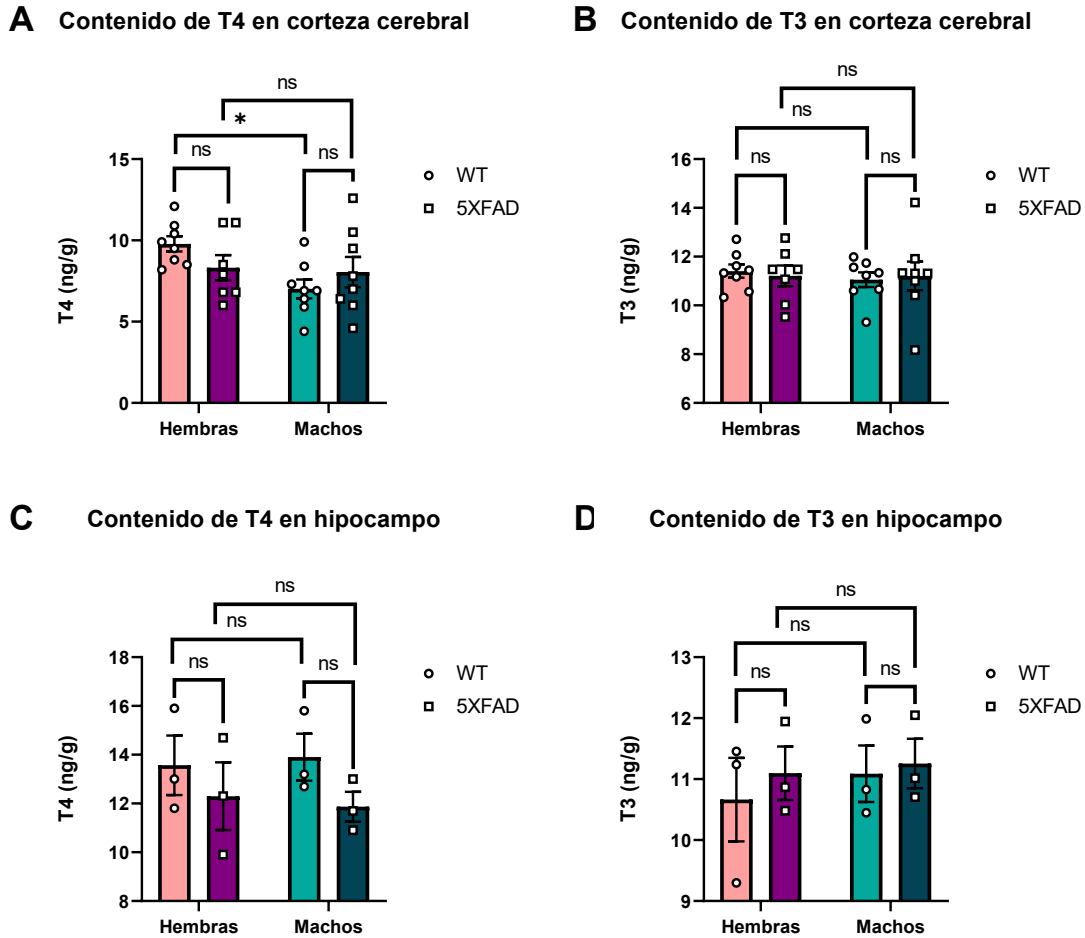


Figura 10. Contenido de T4 y T3 en corteza cerebral e hipocampo de ratones 5XFAD y WT. Contenido de T4 y T3 en la corteza cerebral (**A**), (**B**) y en el hipocampo (**C**), (**D**). Tanto machos como hembras 5XFAD presentan contenido de T4 y T3 comparables sus controles en todas las regiones analizadas. Una observación relevante es que las hembras WT muestran un contenido significativamente más alto de T4 en la corteza cerebral en comparación con los machos WT, lo que concuerda con las diferencias observadas en los niveles plasmáticos. ns: no significativo. * $p < 0,05$. (A, B: $n=31$; C, D: $n=32$).

De forma similar, los machos 5XFAD presentaron un contenido de T4 y T3 tanto en la corteza (T4: $8,05 \pm 2,64$ ng/mL; T3: $11,21 \pm 1,67$ ng/mL) como en el hipocampo (T4: $11,87 \pm 1,06$ ng/mL; T3: $11,26 \pm 0,70$ ng/mL) que no difirió significativamente de los machos WT (corteza: T4: $7,01 \pm 1,64$ ng/mL; T3: $11,05 \pm 0,86$ ng/mL; hipocampo: T4: $13,90 \pm 1,66$ ng/mL; T3: $11,09 \pm 0,80$ ng/mL) (**Figura 10**).

Al comparar entre sexos, se identificó una única diferencia significativa: las hembras WT presentaron un contenido de T4 más alto en la corteza cerebral en comparación con los machos WT (**Figura 10A**), lo que resulta consistente con los perfiles plasmáticos observados.

En conjunto, estos resultados indican que, a pesar de las alteraciones periféricas en la disponibilidad de HT, el contenido cerebral de T3 y T4 en corteza e hipocampo se mantiene estable en ambos sexos del modelo 5XFAD, lo que sugiere la existencia de mecanismos compensatorios intermediarios.

9.6 MAYOR EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE HT MCT8 EN LA BHE DE MACHOS 5XFAD

Pese a la disminución observada en los niveles plasmáticos de HT en machos 5XFAD, el contenido de T3 y T4 en corteza cerebral e hipocampo se mantuvo sin cambios significativos, sugiriendo la existencia de mecanismos compensatorios a nivel central. En este contexto, se evaluó la expresión del transportador de HT MCT8 en la BHE, dada su importante función en la regulación del ingreso y disponibilidad de estas hormonas en el cerebro (Figura 11).

A Expresión de MCT8 en vasos sanguíneos

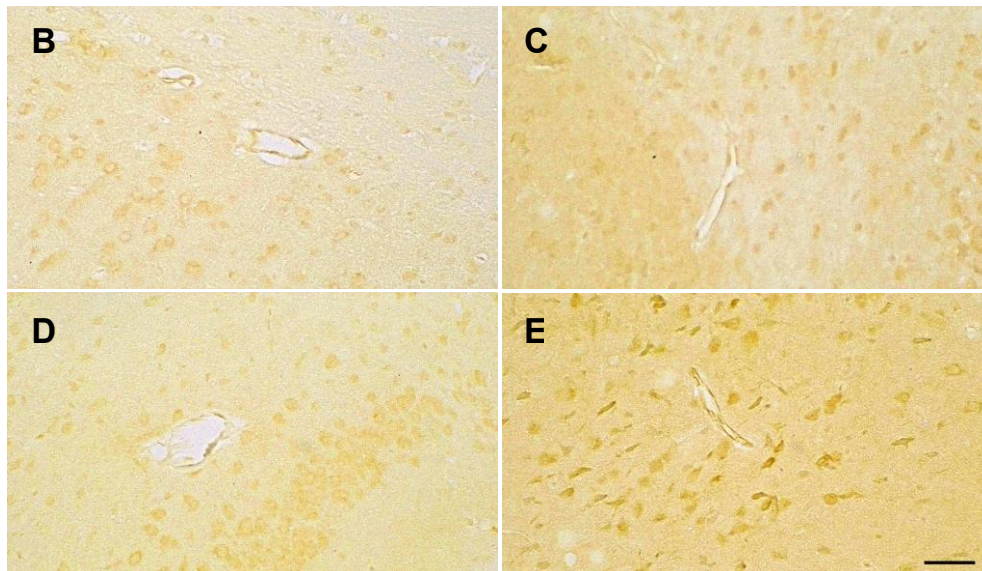
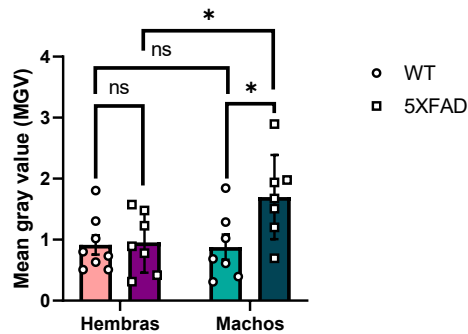


Figura 11. Cuantificación de la expresión de MCT8 en vasos sanguíneos corticales de animales WT y 5XFAD. Expresión de MCT8 en vasos sanguíneos (A). Los machos 5XFAD presentan mayor inmunomarcaje que sus controles WT. Por el contrario, no se observan diferencias significativas entre hembras 5XFAD y WT. Imágenes representativas de inmunohistoquímica para MCT8 corteza cerebral (B) Hembra WT, (C) Hembra 5XFAD, (D) Macho WT y (E) Macho 5XFAD. La barra en (E) representa 50 micras. ns: no significativo; *p < 0,05. (A: n=29).

La cuantificación de la intensidad de inmunomarcaje para MCT8 en los vasos sanguíneos de corteza cerebral (**Figura 11A**) mostró valores similares entre hembras WT ($0,91 \pm 0,45$) y 5XFAD ($0,95 \pm 0,50$), sin diferencias significativas. En contraste, los machos 5XFAD presentaron una mayor expresión de MCT8 ($1,7 \pm 0,69$) en comparación con los machos WT ($0,88 \pm 0,55$). Comparando según sexo, no se encontraron diferencias significativas en los animales WT, mientras que en el grupo 5XFAD los machos exhibieron una expresión significativamente mayor que las hembras.

Estos resultados sugieren la activación de un mecanismo compensatorio en los machos 5XFAD, que posee concentraciones menores de T3 y T4 en el plasma, mediante el aumento de la expresión del transportador MCT8 en la BHE.

9.7 EXPRESIÓN CONSERVADA DE *Dio2* Y *Dio3* EN EL CEREBRO DE RATONES 5XFAD

Considerando que la disponibilidad intracelular de HT está finamente regulada por la acción de las desyodasas, se evaluó el metabolismo local mediante la cuantificación de los niveles de ARNm de *Dio2* y *Dio3*, con el objetivo de determinar si alteraciones en la expresión de estas enzimas podían explicar el mantenimiento de la homeostasis cerebral observado en este modelo animal (**Figura 12**).

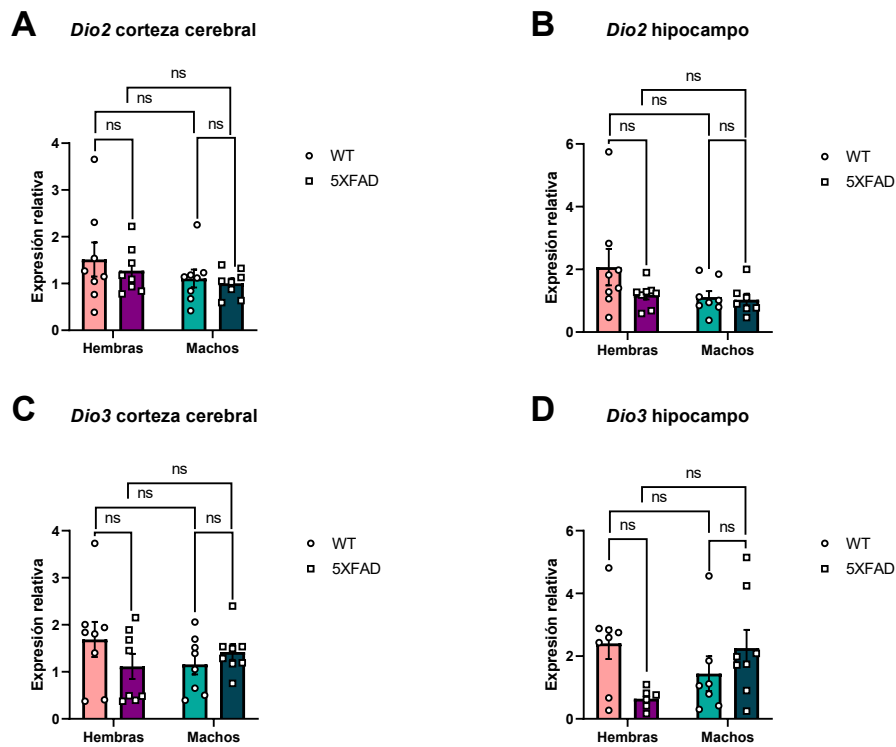


Figura 12. Expresión de *Dio2* y *Dio3* en corteza cerebral e hipocampo de ratones WT y 5XFAD. Niveles de ARNm de *Dio2* en corteza cerebral (A) e hipocampo (B), y de *Dio3* en corteza cerebral (C) e hipocampo (D). La expresión de *Dio2* y *Dio3* no presenta diferencias significativas entre genotipos ni sexos en ninguna de las dos regiones analizadas. ns: no significativo. (A-C: n=32; D: n=31).

La expresión de *Dio2* se mantuvo sin cambios entre los machos 5XFAD y WT en la corteza cerebral (5XFAD: $1,0 \pm 0,29$; WT: $1,11 \pm 0,54$) ni en el hipocampo (5XFAD: $1,034 \pm 0,50$; WT: $1,12 \pm 0,54$). De igual manera, no se observaron diferencias significativas entre hembras, ni en la corteza (5XFAD: $1,28 \pm 0,50$; WT: $1,51 \pm 1,03$) ni en el hipocampo (5XFAD: $1,19 \pm 0,41$; WT: $2,07 \pm 1,64$) (**Figura 12A, B**). Asimismo, la expresión de *Dio3* no mostró diferencias significativas entre los animales 5XFAD y WT en ninguno de los dos sexos, ni en la corteza cerebral (macho 5XFAD: $1,42 \pm 0,47$; WT: $1,16 \pm 0,60$; hembra 5XFAD: $1,12 \pm 0,75$; WT: $1,69 \pm 1,06$), ni en el hipocampo (macho 5XFAD: $2,26 \pm 1,64$; WT: $1,44 \pm 1,47$; hembra 5XFAD: $0,64 \pm 0,32$; WT: $2,41 \pm 1,41$) (**Figura 12C**).

Estos resultados sugieren que las desyodasas *Dio2* y *Dio3* no forman parte de los mecanismos compensatorios en este modelo, pues no experimentan una regulación en respuesta al hipotiroidismo sistémico de los machos 5XFAD.

9.8 CAMBIOS REGIÓN- Y SEXO-ESPECÍFICOS EN LA EXPRESIÓN DEL GEN SENSIBLE A T₃ Hr, Y EXPRESIÓN CONSERVADA DE LOS RECEPTORES *Thra1* Y *Thrb1*

Para evaluar si la aparente normalización del contenido de T₃ y T₄ en el cerebro se reflejaba en una señalización funcional adecuada de T₃, se analizó la expresión del gen *Hr*, el cual es regulado positivamente y en forma directa por T₃ (**Figura 13**).

Las hembras 5XFAD mostraron una menor expresión del ARNm de *Hr* en el hipocampo (5XFAD: $1,17 \pm 0,13$; WT: $2,03 \pm 0,75$), sin cambios significativos en la corteza cerebral en comparación con las hembras WT (5XFAD: $1,0 \pm 0,25$; WT: $1,0 \pm 0,33$). En contraste, los machos 5XFAD no mostraron diferencias significativas en la expresión de *Hr* en relación con sus controles WT ni en la corteza cerebral (5XFAD: $0,91 \pm 0,42$; WT: $1,08 \pm 0,41$) ni en el hipocampo (5XFAD: $0,99 \pm 0,66$; WT: $1,05 \pm 0,33$). Con respecto a las diferencias de sexo, las hembras WT mostraron una mayor expresión de *Hr* que los machos WT en el hipocampo (**Figura 13A, B**).

En conjunto, estos resultados evidencian una desregulación en la expresión génica sensible a T₃ de manera sexo y región dependiente en el modelo 5XFAD.

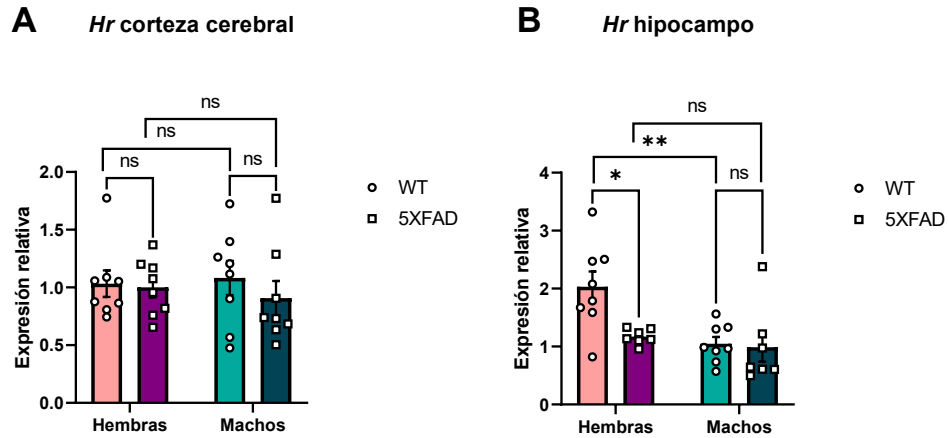


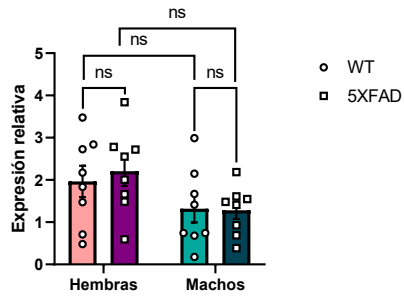
Figura 13. Expresión del gen *Hr* en corteza cerebral e hipocampo de ratones WT y 5XFAD. Niveles de ARNm de *Hr* en corteza cerebral (A) e hipocampo (B). La expresión de *Hr* se mantiene en la corteza cerebral de ambos sexos del modelo 5XFAD; en cambio, en el hipocampo presenta una expresión significativamente menor en las hembras 5XFAD, mientras que se conserva en los machos 5XFAD, en comparación con sus respectivos controles. ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (A: $n=32$; B: $n=30$).

Finalmente, con el objetivo de explorar si la alteración en la expresión de *Hr* podría estar vinculada a cambios en los RHT, se analizaron los niveles de ARNm de *Thra1* y *Thrb1* en la corteza cerebral y el hipocampo de ratones WT y 5XFAD (**Figura 14**).

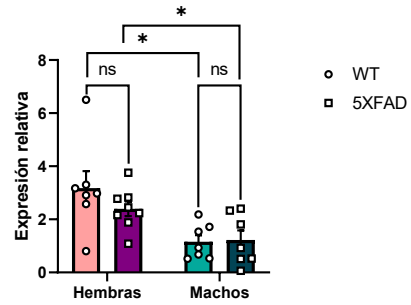
La expresión de *Thra1* no varió significativamente entre hembras 5XFAD y WT, ni en la corteza cerebral (5XFAD: $2,21 \pm 0,99$; WT: $1,97 \pm 1,05$) ni en el hipocampo (5XFAD: $2,40 \pm 0,78$; WT: $3,18 \pm 1,70$). De la misma manera, los machos 5XFAD no presentaron variaciones en la corteza cerebral (5XFAD: $1,28 \pm 0,58$; WT: $1,32 \pm 0,93$) ni en el hipocampo (5XFAD: $1,22 \pm 0,93$; WT: $1,16 \pm 0,66$) en comparación con sus controles. Cabe destacar que las hembras WT y 5XFAD mostraron una mayor expresión de *Thra1* que sus machos respectivos en la región del hipocampo (**Figura 14A, B**).

Por otra parte, en el caso de *Thrb1*, no mostró diferencias significativas entre hembras 5XFAD y WT, tanto en la corteza cerebral (5XFAD: $1,15 \pm 0,49$; WT: $1,43 \pm 0,71$) como en el hipocampo (5XFAD: $0,72 \pm 0,23$; WT: $1,79 \pm 1,80$). De igual forma, en los machos no se observaron variaciones en la corteza cerebral (5XFAD: $0,91 \pm 0,34$; WT: $1,10 \pm 0,45$) ni en el hipocampo (5XFAD: $1,84 \pm 2,03$; WT: $1,14 \pm 0,60$) en comparación con sus controles (**Figura 14C, D**).

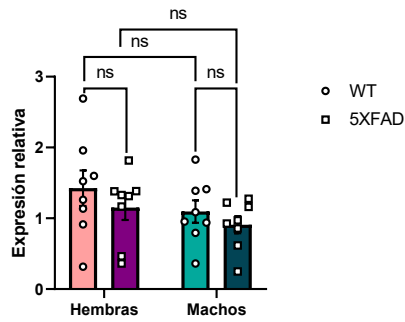
A *Thra1* corteza cerebral



B *Thra1* hipocampo



C *Thrb1* corteza cerebral



D *Thrb1* hipocampo

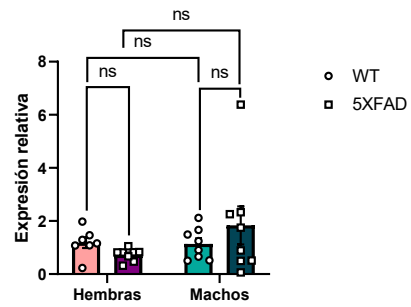


Figura 14. Expresión de *Thra1* y *Thrb1* en corteza cerebral e hipocampo de ratones WT y 5XFAD. Niveles de ARNm de *Thra1* y *Thrb1* en corteza cerebral (A, C) e hipocampo (B, D). La expresión de *Thra1* y *Thrb1* se mantuvo sin diferencias significativas entre genotipos en ambas regiones estudiadas. ns: no significativo; * $p < 0,05$. (A, C, D: $n=32$; B: $n=29$).

10. DISCUSIÓN

La EA es un trastorno neurodegenerativo cuyos mecanismos fisiopatológicos aún no se comprenden por completo. Entre los factores potencialmente involucrados, las HT han sido objeto de creciente interés, ya que múltiples estudios han reportado asociaciones entre alteraciones en sus niveles y la EA. Sin embargo, la evidencia sigue siendo inconsistente y los mecanismos subyacentes permanecen poco explorados.

En este estudio se abordó esta relación de manera integral, caracterizando la dinámica de las HT en el modelo murino 5XFAD de EA de 7 meses de edad, etapa en la que la patología está ya bien establecida, pero sin alcanzar aún una pérdida neuronal masiva, prestando especial interés a las posibles diferencias entre sexos.

Por primera vez en este modelo se evaluó la disponibilidad y acción de T₃ y T₄, midiendo sus concentraciones tanto en suero como en tejido cerebral. En la periferia, se caracterizó la morfología y funcionalidad de la hipófisis y la tiroides. En el sistema nervioso central, se analizó la expresión del transportador MCT8 en la BHE, y en corteza cerebral e hipocampo se evaluó la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo intracelular de HT, cuantificamos un gen canónico regulado por T₃, y estudiamos la expresión RHT para abordar la acción de esta hormona.

10.1 ALTERACIONES SEXO-DEPENDIENTES EN EL EJE HPT DEL MODELO 5XFAD

Estudios previos han evidenciado reducciones en los niveles de HT plasmáticos y cerebrales en pacientes con EA, aunque sin explorar las diferencias sexuales. Los resultados del presente estudio muestran que los machos 5XFAD presentan menores niveles séricos de T₃ y T₄ frente a los controles, mientras que las hembras no presentan cambios significativos. Estos hallazgos indican que la EA genera alteraciones en la disponibilidad periférica de T₃ y T₄ dependientes del sexo. En conjunto con esto, nuestros datos sugieren la existencia de mecanismos que podrían proteger a las hembras o predisponer a los machos al hipotiroidismo periférico en la EA.

Un mecanismo que podría explicar los niveles más bajos de HT en machos 5XFAD involucra alteraciones en el eje HPT. De hecho, existe evidencia en la literatura que reporta a pacientes con EA con niveles plasmáticos alterados de TRH (143,153) y TSH (142,143,145,146), lo que sugiere una regulación endocrina modificada. Algunos trabajos incluso han asociado niveles reducidos de TSH con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (141,144,154). Considerando estos antecedentes, en este estudio se evaluaron las glándulas hipófisis y tiroides, para explorar posibles diferencias en la función del eje HPT.

En machos 5XFAD, la adenohipófisis presentó un mayor tamaño respecto a los controles. Este hallazgo sugiere, la posible activación de un mecanismo compensatorio ante niveles plasmáticos reducidos de HT, en donde la glándula se hipertrofia para generar una mayor función. Sin embargo, no observamos mayor

intensidad del inmunomarcaje de TSH, que podría ser esperable, aunque esto no necesariamente reflejaría un aumento en el contenido de TSH. Para confirmar estos resultados sería necesario cuantificar las células tirotropas y sobre todo los niveles de TSH plasmáticos, mediciones que no se abarcaron en este trabajo y que serán considerados en futuros estudios.

El hallazgo del análisis morfofuncional de la tiroides sugiere que los machos 5XFAD presentan una mayor actividad de la glándula tiroides. Estos animales exhiben glándulas y folículos tiroideos de mayor tamaño, con un epitelio cuboidal más alto, indicativo de mayor actividad tiroidea. Así mismo, un 50% de los folículos presentaban zonas de reabsorción, en comparación al 0,7% de los machos WT, en línea con un estado de hiperfunción tiroidea. Además, presentaron una mayor inmunoseñal de TG en la región apical de las células foliculares, lo que sugiere una mayor recaptación de TG. Así mismo, la expresión de PAX-8, proteína conocida por activar la transcripción de TG, se encontró aumentada los machos 5XFAD, coincidente con la mayor expresión de TG. Por otro lado, la ausencia de cambios en TTF-1 sugiere que esta proteína podría tener un rol menor en la regulación de TG en machos, destacando un posible mecanismo sexo-dependiente en la regulación tiroidea del modelo 5XFAD.

En conjunto, los hallazgos morfofuncionales en hipófisis y tiroides de machos 5XFAD podrían sugerir una posible una estimulación compensatoria de la adenohipófisis, que activaría la glándula tiroides frente a la disminución de HT plasmáticas en estos animales.

En contraste, las hembras 5XFAD mostraron un patrón opuesto al de los machos, evidenciando alteraciones sexo-dependientes en el eje HPT. La adenohipófisis de estos animales no mostró diferencias en cuanto a tamaño glandular. En cuanto a la expresión de TSH de las células tirotropas, esta fue menor que en las hembras WT, lo que sugiere una menor secreción de esta hormona y en consecuencia una menor estimulación de la glándula tiroides. Este resultado concuerda con el estudio de Yong-Hong et al., 2013 (143), que reporta niveles reducidos de TSH plasmática en pacientes con EA, aunque el estudio no analizó los resultados por sexo.

El análisis de la tiroides de las hembras 5XFAD mostró una glándula y folículos tiroideos más pequeños, con un epitelio folicular plano, indicativo de hipofunción. Esta tendencia se reflejó también en las escasas zonas de reabsorción observadas, y en la menor intensidad del inmunomarcaje de TG en el polo apical de las células foliculares, sugiriendo una recaptación reducida por los tirocitos. Finalmente, los factores de transcripción TTF-1 y PAX-8 mostraron expresión disminuida, consistente con un estado de menor función tiroidea. En conjunto, estos hallazgos sugieren que en las hembras 5XFAD existe una reducción de la actividad de la adenohipófisis y por consiguiente de la tiroides.

A pesar de lo anterior, los niveles plasmáticos de T₃ y T₄ permanecieron estables en las hembras 5XFAD, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos compensatorios que no se han analizado en ese estudio.

Dado que la concentración circulante de HT depende en gran medida de la desyodación periférica, es plausible que diferencias sexuales en la expresión o actividad de la DIO1 contribuyan a esta estabilidad. DIO1 es la principal enzima que convierte T4 en T3 en tejidos periféricos (155) y se ha reportado que su expresión es mayor en hembras (156). Esto podría favorecer la conversión eficiente de T4 a T3, manteniendo niveles plasmáticos estables incluso en presencia de patología asociada a EA. Sin embargo, es necesario evaluar la expresión y actividad de DIO1 en este modelo para confirmar su participación.

Por otro lado, los esteroides gonadales modulan la concentración de TBG, clave para el transporte de HT. La evidencia en la literatura indica que los estrógenos aumentan la TBG sérica (157,158), mientras que los andrógenos la reducen (158,159). En este contexto, los mayores niveles de estrógenos en hembras podrían actuar como factor protector, prolongando la vida media de las HT y estabilizando sus concentraciones plasmáticas pese a la presencia de EA. Considerando que la EA ocurre principalmente en edades avanzadas, cuando los estrógenos plasmáticos disminuyen, la ausencia de este factor protector podría contribuir a la progresión diferencial de la enfermedad, lo que resulta relevante considerando que el sexo femenino constituye un factor de riesgo para la EA (160). Para abordar esto, es importante que futuros estudios determinen los niveles de estrógenos, TBG y HT libres y totales en hembras de distintas edades del modelo 5XFAD.

Por otra parte, otro posible mecanismo involucrado en la normalización de los niveles de HT en el plasma de las hembras 5XFAD, es un aumento en la dinámica de exportación de HT desde las células foliculares hacia la circulación sanguínea, para lo que sería necesario estudiar la expresión de transportadores como MCT8 y MCT10 en las células foliculares de la tiroides.

Finalmente, considerando que TTF-1 y PAX-8 pueden formar un complejo funcional y que sus sitios de unión al ADN colocalizan en promotores de genes relevantes para el funcionamiento de la tiroides (64), sería relevante evaluar proteínas clave como TPO, NIS o pendrina en el modelo 5XFAD para comprender mejor los mecanismos moleculares subyacentes a las alteraciones descritas anteriormente.

10.2 MODIFICACIONES SEXO- Y REGIÓN-DEPENDIENTES EN LA DINÁMICA DE HT EN EL CEREBRO 5XFAD

Curiosamente, a pesar del hipotiroidismo periférico en machos 5XFAD, así como las alteraciones observadas en hipófisis y tiroides en ambos sexos, los resultados de las mediciones de HT en corteza cerebral e hipocampo indicaron que el contenido de T3 y T4 en ratones 5XFAD se mantuvo dentro del rango normal.

La evidencia en humanos y roedores con EA indica que un contenido más bajo de estas hormonas en cerebro y LCR corresponde aparentemente a un fenómeno tardío: mientras que en etapas iniciales se han

reportado contenidos normales de HT, en fases avanzadas de la enfermedad se han documentado contenidos menores en comparación a pacientes controles (132,146,148).

En el mismo contexto, es importante señalar que en el modelo 5XFAD, la pérdida neuronal significativa ocurre alrededor de los 9 meses de edad (161). Por tanto, aunque los ratones de 7 meses que hemos estudiado ya presentan una acumulación considerable de placas de A β y déficits cognitivos (30,162), aún no han alcanzado un estadio de neurodegeneración avanzada, y por tanto una fase avanzada de la enfermedad, lo que podría explicar el contenido cerebral de HT aparentemente normal. En consecuencia, es esencial que futuros estudios evalúen si en fases más avanzadas de la enfermedad estos animales presentan alteraciones en el contenido de HT cerebral.

Por otro lado, la normalización del contenido de HT cerebral en los machos 5XFAD sugiere que el cerebro preserva su homeostasis hormonal, lo que indica la existencia de mecanismos compensatorios que mantienen la disponibilidad de HT, al menos en las regiones estudiadas en esta tesis. Uno de estos mecanismos es la sobreexpresión del transportador MCT8 en los vasos sanguíneos de la corteza frontal, fenómeno no observado en las hembras 5XFAD. La mayor presencia de esta proteína incrementaría la captación de HT hacia el parénquima cerebral, compensando el hipotiroidismo periférico para mantener la homeostasis hormonal intracerebral.

Resulta igualmente relevante considerar que en roedores el transportador OATP1C1 también desempeña un papel crucial en el ingreso de HT al sistema nervioso central. De este modo, futuras investigaciones deberían explorar el rol de este transportador en condiciones de EA, y así comprender con mayor profundidad los mecanismos adaptativos que sostienen la homeostasis tiroidea en este modelo.

Dado que los transportadores no actúan de forma aislada, para explorar otros posibles mecanismos responsables del estado eutiroideo del cerebro, extendimos nuestro análisis a las desyodasas cerebrales, enzimas encargadas del metabolismo intracelular de las HT y por tanto de su disponibilidad local. Puesto que los niveles de ARNm de *Dio2* y *Dio3* se mantuvieron sin cambios en los animales 5XFAD de ambos sexos, podemos inferir que el contenido normal de T₃ y T₄ en el tejido cerebral no es atribuible a una expresión compensatoria al alza de *Dio2*, ni a la baja de *Dio3*. No obstante, dado que la expresión génica no necesariamente se traduce en actividad enzimática, resulta indispensable medir la actividad de *Dio2* y *Dio3*, los niveles de proteína, así como los metabolitos asociados como T₂ y rT₃, sobre todo considerando que se han reportado concentraciones elevadas de rT₃ en pacientes con EA (163).

A continuación, para evaluar si la aparente normalización del contenido de T₃ y T₄ en el cerebro se reflejaba en una señalización funcional adecuada de T₃, se analizó la expresión del gen *Hr*, regulado positivamente por T₃. De manera interesante, a pesar del contenido normal de HT cerebral en este modelo, observamos menores niveles del ARNm de *Hr* en el hipocampo de las hembras 5XFAD, mientras

que los machos no presentaron diferencias. Este patrón sugiere una reducción en la señalización de T₃ de manera sexo y región-dependiente.

No obstante, aunque *Hr* es una diana transcripcional bien establecida de T₃ (164,165,113), no se puede descartar que su expresión también pueda verse influenciada por otras vías, como la señalización estrogénica, la regulación epigenética o a mecanismos fisiopatológicos propios de la EA, como, por ejemplo, señales propias del microambiente inflamatorio de la enfermedad. Por otro lado, no puede descartarse que existan diferencias en la señalización de HT restringidas a poblaciones celulares específicas: ciertas neuronas o células gliales podrían experimentar variaciones locales sutiles en la disponibilidad o acción de T₃, que resultarían invisibles en los análisis de tejido completo. En este contexto, es importante considerar que las alteraciones locales en la acción hormonal podrían preceder a cambios detectables en el contenido total del tejido. Para esclarecer y profundizar este punto, sería relevante emplear aproximaciones que permitan evaluar la expresión y distribución de *Hr* en tipos celulares definidos, considerando no solo el nivel de ARNm y proteína, sino también su localización tisular y subcelular.

Tomando en cuenta que la señalización intracelular de T₃ depende no solo de la disponibilidad nuclear y de la actividad de DIO₂ y DIO₃, sino también de la abundancia y ocupación de los RHT (166), también quisimos evaluar si la desregulación de *Hr* en las hembras podría estar relacionada con cambios en la expresión de *Thra1* y *Thrb1*. Nuestros resultados indican que estos receptores nucleares mantuvieron su expresión normal en ratones 5XFAD, y sugieren que la alteración en la expresión de *Hr* en el cerebro de la EA no se puede atribuir a cambios transcripcionales en las isoformas *Thra1* y *Thrb1*. Sin embargo, es interesante considerar que tanto las hembras WT como 5XFAD presentan mayor expresión de *Thra1* en el hipocampo que los machos, lo que sugiere que el hipocampo femenino podría ser más sensible a la acción de la T₃. De hecho, la expresión de *Hr* en el hipocampo fue mayor en las hembras WT que en los machos WT. En este contexto, pequeños cambios en la disponibilidad de T₃ en el hipocampo en 5XFAD podrían tener mayores efectos en las hembras que en los machos.

Teniendo en consideración la homeostasis alterada del eje HPT evidenciada en este trabajo, y que se ha descrito ampliamente que el receptor *Thrb2* se expresa principalmente en el hipotálamo y la hipófisis, donde es un regulador clave del eje HPT, no podemos descartar que mecanismos asociados a la EA provoquen desregulación de *Thrb2*. Por lo tanto, es fundamental que futuras investigaciones se enfoquen en el estudio de estos mecanismos que podrían jugar un papel importante en la fisiopatología de la EA.

Por último, dado que los machos 5XFAD presentan hipotiroidismo periférico y modificaciones en el transporte central de HT, y las hembras 5XFAD muestran alteraciones en la acción de T₃, resulta pertinente evaluar estas variables en un modelo 5XFAD suplementado con T₄ y T₃. Esta intervención permitiría determinar si la restauración de los niveles periféricos de HT corrige las disfunciones observadas y mejora

parámetros cognitivos asociados a la EA. Estudios previos respaldan esta estrategia: la suplementación con T₃ en animales hipotiroideos normaliza la potenciación a largo plazo en el hipocampo, revierte déficits de memoria y modula la neuroinflamación, la producción de A β y vías de señalización relacionadas con la plasticidad sináptica (167,168). Además, en un modelo farmacológico de EA inducido por estreptozotocina, el tratamiento con T₃ redujo la neuroinflamación y mejoró la supervivencia celular (169), consolidando la pertinencia de explorar esta estrategia en el modelo 5XFAD.

En conjunto, este trabajo proporciona la primera evidencia sobre los niveles, metabolismo, transporte y acción de las HT en un modelo transgénico de EA, ofreciendo nuevos conocimientos acerca de la dinámica entre la periferia y el cerebro de estas hormonas en el contexto de esta patología (**Figura 15**).

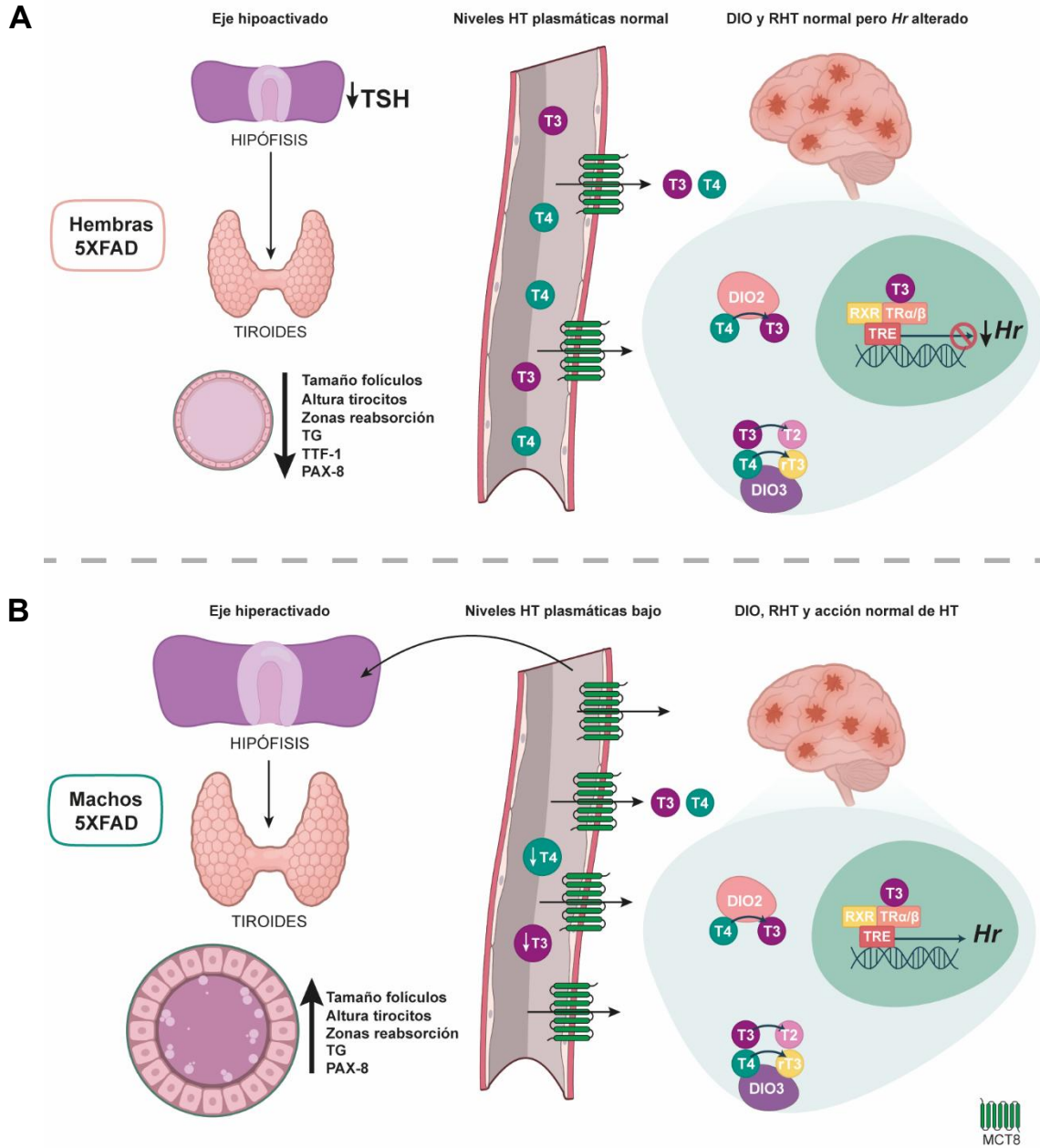


Figura 15. Dinámica de las hormonas tiroideas en el modelo murino 5XFAD. En las hembras 5XFAD (A), el eje hipófisis-tiroides se encuentra hipoactivado, evidenciado por una menor expresión de TSH en la hipófisis y una glándula tiroides con rasgos morfológicos y funcionales de menor actividad. Sin embargo, los niveles plasmáticos y cerebrales de HT se mantienen estables, aunque acompañados con de alteraciones en la señalización cerebral de T₃, reflejadas en una menor expresión de *Hr*. En los machos 5XFAD (B), en cambio, los niveles plasmáticos de HT se reducen, en conjunto con una hipófisis de mayor tamaño y de una tiroides con indicadores de mayor actividad, conformando un aparente mecanismo compensatorio periférico. Paralelamente, la mayor expresión del transportador MCT8 en la BHE favorece una mayor entrada de HT al cerebro, lo que estabiliza su contenido en el parénquima. Gracias a este sistema de compensación dual, la acción de T₃ se preserva, manteniendo una expresión normal de *Hr* en el cerebro.

11. CONCLUSIONES

1. Los machos 5XFAD presentan menores niveles de T3 y T4 en el plasma, en comparación a sus controles, mientras que las hembras exhiben concentraciones normales.
2. Tanto machos como hembras 5XFAD presentan un contenido normal de T3 y T4 en el cerebro.
3. Los machos 5XFAD presentan una hipófisis y tiroides de mayor tamaño en comparación a sus controles, así como indicadores de mayor actividad tiroidea, lo que podría corresponder a un posible mecanismo compensatorio al hipotiroidismo periférico observado.
4. En las hembras 5XFAD presentan una menor expresión de TSH en la hipófisis y una glándula tiroides con rasgos morfológicos y funcionales de menor actividad.
5. Existe una regulación sexo-dependiente del eje HPT en el modelo 5XFAD.
6. Los machos presentan una mayor expresión del transportador MCT8 en la BHE a nivel cortical, lo que sugiere un mecanismo compensatorio para preservar la disponibilidad cerebral de HT.
7. Las hembras 5XFAD exhiben una menor expresión de *Hr* en el hipocampo, lo que sugiere que la señalización de T3 es sexo y región-dependiente.
8. *Dio2*, *Dio3*, *Thra1* y *Thrb1* se expresan normalmente en los animales 5XFAD, por lo que no son alterados producto de la fisiopatología de la EA.
9. Las hembras WT y 5XFAD presentan mayor expresión de *Thra1* que los machos de ambos genotipos, lo que podría generar una mayor sensibilidad a la acción de la T3 y susceptibilidad en la EA.
10. El sexo es una variable biológica crítica en el análisis de la EA y sus alteraciones neuroendocrinas.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. F1000Research. F1000 Research Ltd; 2018;7.
2. World Health Organization. WHO Fact Sheet: Dementia. WHO [Internet] 2023. [citado 26 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
3. World Alzheimer Report 2023 Reducing dementia risk: never too early, never too late.
4. Klaassen GP, Werlinger EE, Contreras EL, González BA, Vera CA, Juica AS, et al. Calidad de vida en demencia Alzheimer: un nuevo desafío. *Rev Chil Neuro-Psiquiat*. 2021;59(4):361-7.
5. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. 1995;973-7.
6. Wu L, Rosa-Neto P, Hsiung GYR, Sadovnick AD, Masellis M, Black SE, et al. Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Canadian Journal of Neurological Sciences*. 2012;39(4):436-45.
7. Andrade-Guerrero J, Santiago-Balmaseda A, Jeronimo-Aguilar P, Vargas-Rodríguez I, Ruth Cadena-Suárez A, et al. Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. *Int J Mol Sci*. 2023;24:3754.
8. Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, et al. National institute on aging- Alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: A practical approach. *Acta Neuropathol*. 2012;123(1):1-11.
9. Janeiro MH, Ardanaz CG, Sola-Sevilla N, Dong J, Cortés-Erice M, Solas M, et al. Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer. *Advances in Laboratory Medicine*. 2021;2(1):39-50.
10. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(5).
11. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(2):101-12.
12. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly. 1975;72(5):1858-62.
13. Pîrșcoveanu DFV, Pirici I, Tudorică V, Bălșeanu T, Albu VC, Bondari S, et al. Tau protein in neurodegenerative diseases-a review. *Rom J Morphol Embryol [Internet]*. 2017(4):1141-50.

14. Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The Topographical and Neuroanatomical Distribution of Neurofibrillary Tangles and Neuritic Plaques in the Cerebral Cortex of Patients with Alzheimer's Disease. *Cerebral Cortex* [Internet]. 1991;1:103–16.
15. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1).
16. Sharma P, Srivastava P, Seth A, Tripathi PN, Banerjee AG, Shrivastava SK. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. *Prog Neurobiol*. 2019;174:53–89.
17. Lei P, Ayton S, Bush AI. The essential elements of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;296.
18. Neha, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N. Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci*. 2014;109(2):73–86.
19. Erickson CA, Barnes CA. The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol* [Internet]. 2003;38:61–9.
20. Ford M, Gunn-Moore FJ, Dagleish MP. Spontaneous mammalian models for Alzheimer's disease and dementia. *Brain Commun*. 2025;7(4).
21. Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, Nabeshima T. B-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett*. 1994;170:63–6.
22. Riedel G, Kang SH, Choi DY, Platt B. Scopolamine-induced deficits in social memory in mice: Reversal by donepezil. *Behavioural Brain Research*. 2009;204(1):217–25.
23. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm*. 2013;120(1):233–52.
24. Holcomb L, Gordon M, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nature Medicine*. 1998;4(1):97-100.
25. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A and Synaptic Dysfunction. *Neuron*. 2003;39(3):409–21.

26. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nat Genet.* 1992;1:345-7.
27. Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-Tur J, Prihar G, Pfeiffer E, et al. A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A β 42(43). *Hum Mol Genet.* 1997;6(12):2087-9.
28. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991;349:704-6.
29. Citron M, Eckman C, Diehl T, Corcoran C, Ostaszewski B, Xia W, et al. Additive Effects of PS1 and APP Mutations on Secretion of the 42-Residue Amyloid β -Protein. *Neurobiol Dis.* 1998;5:107-16.
30. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience.* 2006;26(40):10129-40.
31. Agueda A, Rostagno. Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2023;24(1):107.
32. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2014;1842(8):1219-31.
33. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (review). *Biomed Rep.* 2016;4(5):519-22.
34. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2010;20(SUPPL.2):265-79.
35. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions.* 2018;4:575-90.
36. Gartner L, Hiatt J. *Textbook and Atlas of Histology.* 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2013.
37. Guyton y Hall. *Compendio de fisiología médica.* 14^a ed. Madrid; 2021.
38. Báñez-López S, Guadaño-Ferraz A. Thyroid hormone availability and action during brain development in rodents. *Front Cell Neurosci.* 2017;11.

39. Brix K, Führer D, Biebermann H. Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - Known facts and future perspectives. *Thyroid Res.* 2011;4(SUPPL. 1).
40. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature.* 1996;379:458–60.
41. Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, et al. Pendrin, the Protein Encoded by the Pendred Syndrome Gene (PDS), Is an Apical Porter of Iodide in the Thyroid and Is Regulated by Thyroglobulin in FRTL-5 Cells. *Endocrinology.* 2000;141(2):839–45.
42. DeGroot LJ, Davis AM. Studies on the Biosynthesis of Iodotyrosines: A Soluble Thyroidal Iodide-Peroxidase Tyrosine-Iodinase System. *The Endocrine Society.* 1962;70:492–504.
43. Dunn JT, Dunn AD. Update on Intrathyroidal Iodine Metabolism. *THYROID.* 2001;11(5):407–14.
44. Wetzel BK, Spicer SS, Wollman SH. Changes in fine structure and acid phosphatase localization in rat thyroid cells following thyrotropin administration. *J Cell Biol.* 1965;25:593–618.
45. Van Den Hove MF, Couvreur M, De Visscher M, Salvatore G. A New Mechanism for the Reabsorption of Thyroid Iodoproteins: Selective Fluid Pinocytosis. *Eur J Biochem.* 1982;122(2):415–22.
46. Dunn AD, Crutchfield HE, Dunn JT. Proteolytic Processing of Thyroglobulin by Extracts of Thyroid Lysosomes. *Endocrinology.* 1991;128(6):3073–80.
47. Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;458:6–15.
48. Di Cosmo C, Liao XH, Dumitrescu AM, Philp NJ, Weiss RE, Refetoff S. Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. *Journal of Clinical Investigation.* 2010;120(9):3377–88.
49. Friesema ECH, Jansen J, Jachtenberg JW, Visser WE, Kester MHA, Visser TJ. Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Molecular Endocrinology.* 2008;22(6):1357–69.
50. Takamatsu J, Takeda K, Katayama S, Sakane S, Morita S, Kuma K, et al. Epithelial hyperplasia and decreased colloid content of the thyroid gland in triiodothyronine-predominant Graves' disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1992;75(4):1145–50.

51. Kanno J, Hiroshi Onodera, Furuta K, Maekawa A, Kasuga, And T, Hay Y, et al. Tumor-Promoting Effects of Both Iodine Deficiency and Iodine Excess in the Rat Thyroid. *Toxicol Pathol.* 1992;20(2):226–35.
52. Gupta A, Singhal M, Kalhan S, Gupta A, Singhal O, Kaur V. Cytomorphologic significance of marginal vacuoles in diffuse thyroid enlargements. *J Cytol.* 2013;30(2):125–9.
53. Lee J, Yi S, Kang YE, Kim HW, Joung KH, Sul HJ, et al. Morphological and functional changes in the thyroid follicles of the aged murine and humans. *J Pathol Transl Med.* 2016;50(6):426–35.
54. Schneider P. Thyroidal Iodine Heterogeneity: “Last Come, First Served” System of Iodine Turnover. *Endocrinology* [Internet]. 1964;74:973–80.
55. Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, Spicher K, Van Sande J, Dumont J, et al. The human thyrotropin receptor: A heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Cell Biology* [Internet]. 1996;93:116–20.
56. Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, Mclachlan SM. The Thyrotropin (TSH) Receptor: Interaction with TSH and Autoantibodies. *Endocr Rev.* 1998;19(6):673–716.
57. Latif R, Morshed SA, Ma R, Tokat B, Mezei M, Davies TF. A Gq Biased Small Molecule Active at the TSH Receptor. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11.
58. Shang H, Zhao J, Yao J, Wang H, Dong J, Liao L. Nevirapine Increases Sodium/Iodide Symporter-Mediated Radioiodide Uptake by Activation of TSHR/cAMP/CREB/PAX8 Signaling Pathway in Dedifferentiated Thyroid Cancer. *Front Oncol.* 2020;10.
59. Fernández LP, López-Márquez A, Santisteban P. Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(1):29–42.
60. Endo T, Kaneshige M, Nakazato M, Ohmori M, Harii N, Onaya T. Thyroid Transcription Factor-1 Activates the Promoter Activity of Rat Thyroid Na /I Symporter Gene. *Molecular Endocrinology.* 1997;11:1747–55.
61. Ohno M, Zannini † Mariastella, Levy O, Carrasco N, Lauro R Di. The Paired-Domain Transcription Factor Pax8 Binds to the Upstream Enhancer of the Rat Sodium/Iodide Symporter Gene and Participates in Both Thyroid-Specific and Cyclic-AMP-Dependent Transcription. *Mol Cell Biol.* 1999;19(3):2051–60.
62. Zannini M, Francis-Lang H, Plachov D, Di Lauro R. Pax-8, a Paired Domain-Containing Protein, Binds to a Sequence Overlapping the Recognition Site of a Homeodomain and Activates Transcription from Two Thyroid-Specific Promoters. *Mol Cell Biol.* 1992;12(9):4230–41.

63. Espinoza CR, Schmitt TL, Loos U. Thyroid transcription factor 1 and Pax8 synergistically activate the promoter of the human thyroglobulin gene. *J Mol Endocrinol* [Internet]. 2001;27:59–67.
64. Di Palma T, Nitsch R, Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M. The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(5):3395–402.
65. Mendel C. The Free Hormone Hypothesis: A Physiologically Based Mathematical Model. *Endocr Rev*. 1989;10(3):232–74.
66. Refetoff S, Feingold K, Ahmed F, Anawalt B, Blackman M, Boyce A, et al. *Thyroid Hormone Serum Transport Proteins*. South Dartmouth: Endotext; 2000.
67. Mendel CM, Weisiger RA, Jones AL, Cavalieri RR. Thyroid Hormone-Binding Proteins in Plasma Facilitate Uniform Distribution of Thyroxine within Tissues: A Perfused Rat Liver Study. *Endocrinology*. 1987;120(5):1742–9.
68. Schussler GC. The Thyroxine-Binding Proteins The interposition of strong serum protein binding of T4. *THYROID*. 2000;10(2):141–9.
69. Pardridge WM. *Brain Metabolism: A Perspective From the Blood-Brain Barrier*. American Physiological Society [Internet]. 1983;63(4):1481–535.
70. Chanoinet JP, Alex S, Fang SL, Stone S, Leonard JL, Kijrhle J, et al. Role of Transthyretin in the Transport of Thyroxine from the Blood to the Choroid plexus, the Cerebrospinal Fluid, and the Brain. *Endocrinology*. 1992;130(2):933–8.
71. Bernal J. *Thyroid Hormones in Brain Development and Function*. South Dartmouth: Endotext; 2000.
72. Bernal J, Guadaño-Ferraz A, Morte B. Thyroid hormone transporters-functions and clinical implications. Vol. 11, *Nature Reviews Endocrinology*; 2015. p. 406–17.
73. Pizzagalli F, Hagenbuch B, Stieger B, Klenk U, Folkers G, Meier PJ. Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Molecular Endocrinology*. 2002;16(10):2283–96.
74. Friesema ECH, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(41):40128–35.

75. Lafrenière RG, Carrel L, Willard HF. A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13.2. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1994;3(7):1133–9.
76. Friesema ECH, Jansen J, Milici C, Visser TJ. Thyroid Hormone Transporters. *Vitamines and Hormones*. 2005;70(5):137–67.
77. Wang P, Hata S, Xiao Y, Murray JW, Wolkoff AW. Topological assessment of oatp1a1:a12-transmembrane domain integral membrane protein with three N-linked carbohydrate chains. *Am J Physiol Gastro-intest Liver Physiol* [Internet]. 2008;294:1052–9.
78. Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2011;165:1260–87.
79. Van Der Deure WM, Hansen PS, Peeters RP, Kyvik KO, Friesema ECH, Hegedüs L, et al. Thyroid hormone transport and metabolism by organic anion transporter 1C1 and consequences of genetic variation. *Endocrinology*. 2008;149(10):5307–14.
80. Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, et al. Functional Characterization of Rat Brain-specific Organic Anion Transporter (Oatp14) at the Blood-Brain Barrier: High affinity transporter for thyroxine. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(44):43489–95.
81. Roberts LM, Woodford K, Zhou M, Black DS, Haggerty JE, Tate EH, et al. Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology*. 2008;149(12):6251–61.
82. Heuer H, Maier MK, Iden S, Mittag J, Friesema ECH, Visser TJ, et al. The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology*. 2005;146(4):1701–6.
83. Chan SY, Martín-Santos A, Loubière LS, González AM, Stieger B, Logan A, et al. The expression of thyroid hormone transporters in the human fetal cerebral cortex during early development and in N-Tera-2 neurodifferentiation. *Journal of Physiology*. 2011;589(11):2827–45.
84. López-Espíndola D, García-Aldea Á, Gómez de la Riva I, Rodríguez-García AM, Salvatore D, Visser TJ, et al. Thyroid hormone availability in the human fetal brain: novel entry pathways and role of radial glia. *Brain Struct Funct*. 2019;224(6):2103–19.

85. Ito K, Uchida Y, Ohtsuki S, Aizawa S, Kawakami H, Katsukura Y, et al. Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J Pharm Sci.* 2011;100(9):3939–50.
86. Mayerl S, Müller J, Bauer R, Richert S, Kassmann CM, Darras VM, et al. Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis. *Journal of Clinical Investigation.* 2014;124(5):1987–99.
87. Crantz FR, Silva JE, Larsen PR. An Analysis of the Sources and Quantity of 3,5,3'-Triiodothyronine Specifically Bound to Nuclear Receptors in Rat Cerebral Cortex and Cerebellum. *Endocrinology.* 1982;110(2):367–75.
88. Galton VA, Wood ET, St. Germain EA, Withrow CA, Aldrich G, St. Germain GM, et al. Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development. *Endocrinology.* 2007;148(7):3080–8.
89. St Germain DL. Iodothyronine Deiodinases. *Trends in endocrinology and metabolism.* 1994;5(1):36–42.
90. Köhrle J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;151:103–19.
91. Bianco AC, Larsen PR. Cellular and Structural Biology of the Deiodinases. *THYROID.* 2005;15(8):777–86.
92. Guadaño-Ferraz A, Obregón MJ, St Germain DL, Bernal J. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Neurobiology [Internet].* 1997;94:10391–6.
93. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. *Journal of Neuroscience.* 2008;28(1):264–78.
94. Tu HM, Legradi G, Bartha T, Salvatore D, Lechan RM, Larsen PR. Regional Expression of the Type 3 Iodothyronine Deiodinase Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Central Nervous System and Its Regulation by Thyroid Hormone. *Endocrinology.* 1999;140(2):784–90.
95. Guadaño-Ferraz A, Escámez MJ, Rausell E, Bernal J. Expression of Type 2 Iodothyronine Deiodinase in Hypothyroid Rat Brain Indicates an Important Role of Thyroid Hormone in the Development of Specific Primary Sensory Systems. *The Journal of Neuroscience.* 1999;19(9):3430–9.

96. Benbrook D, Pfahl M. A Novel Thyroid Hormone Receptor Encoded by acDNA Clone from a Human Testis Library. *Science* (1979). 1987;238:788–91.
97. Miyajima N, Horiuchi R, Shibuya Y, Fukushige SI, Matsubara KI, Toyoshima K, et al. Two e&A Homologs Encoding Proteins with Different T₃ Binding Capacities Are Transcribed from Opposite DNA Strands of the Same Genetic Locus. *Cell*. 1989;57:31–9.
98. Schwartzs Harold, Strait K, Ling N, Oppenheimer J. Quantitation of Rat Tissue Thyroid Hormone Binding Receptor Isoforms by Immunoprecipitation of Nuclear Triiodothyronine Binding Capacity. *J Biol Chem*. 1992;267:11794–9.
99. Wallis K, Dudazy S, Van Hogerlinden M, Nordström K, Mittag J, Vennström B. The thyroid hormone receptor α 1 protein is expressed in embryonic postmitotic neurons and persists in most adult neurons. *Molecular Endocrinology*. 2010;24(10):1904–16.
100. Forrest D, Vennström B. Review Functions of Thyroid Hormone Receptors in Mice. *THYROID*. 2000;10(1):41–52.
101. Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE, Wondisford FE. Critical role for thyroid hormone receptor β 2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest*. 2001;107:1017–23.
102. Cook CB, Kakucska I, Lechan RM, Koenig RJ. Expression of Thyroid Hormone Receptor B2 in Rat Hypothalamus. *Endocrinology*. 1992;130(2):1077–9.
103. Childs G V, Taub K, Jones KE, Chin WW. Triiodothyronine Receptor B-2 Messenger Ribonucleic Acid Expression by Somatotropes and Thyrotropes: Effect of Propylthiouracil-Induced Hypothyroidism in Rats. *Endocrinology*. 1991;129(5):2767–73.
104. Yen PM, Sunday ME, Darling DS, Chin WW. Isoform-Specific Thyroid Hormone Receptor Antibodies Detect Multiple Thyroid Hormone Receptors in Rat and Human Pituitaries. *Endocrinology*. 1992;130(3):1539–46.
105. Forrest D, Hanebuth E, Smeyne RJ, Everds N, Stewart CL, Wehner JM, et al. Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor 1: evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *EMBO J*. 1996;15(12):3006–15.
106. Hirahara N, Nakamura HM, Sasaki S, Matsushita A, Ohba K, Kuroda G, et al. Liganded T₃ receptor β 2 inhibits the positive feedback autoregulation of the gene for GATA2, a transcription factor critical for thyrotropin production. *PLoS One*. 2020;15(1).

107. AlAnazi FH, Al-kuraishy HM, Alexiou A, Papadakis M, Ashour MHM, Alnaaim SA, et al. Primary Hypothyroidism and Alzheimer's Disease: A Tale of Two. *Cell Mol Neurobiol*. 2023;43(7):3405–16.
108. Ambrogini P, Cuppini R, Ferri P, Mancini C, Ciaroni S, Voci A, et al. Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology*. 2005;81(4):244–53.
109. Venero C, Guadaño-Ferraz A, Herrero AI, Nordström K, Manzano J, De Escobar GM, et al. Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor $\alpha 1$ can be ameliorated by T₃ treatment. *Genes Dev*. 2005;19(18):2152–63.
110. Bernal J. Mecanismos de regulación por hormona tiroidea en el desarrollo neural. *Endocrinología y Nutrición*. 2001;48(7):202–16.
111. Bernal J. Action of thyroid hormone in brain. *J Endocrinol Invest*. 2002;25(3):268–88.
112. Chatonnet F, Flamant F, Morte B. A temporary compendium of thyroid hormone target genes in brain. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2014;1849(2):122–9.
113. Engelhard A, Christiano AM. The hairless promoter is differentially regulated by thyroid hormone in keratinocytes and neuroblastoma cells. *Exp Dermatol*. 2004;13:257–64.
114. Ramos HE, Weiss RE. Regulation of Nuclear Coactivator and Corepressor Expression in Mouse Cerebellum by Thyroid Hormone. *THYROID*. 2006;16(3):211–6.
115. Hernandez A, Morte B, Belinchón MM, Ceballos A, Bernal J. Critical role of types 2 and 3 deiodinases in the negative regulation of gene expression by T₃ in the mouse cerebral cortex. *Endocrinology*. 2012;153(6):2919–28.
116. Gil-Ibáñez P, Bernal J, Morte B. Thyroid hormone regulation of gene expression in primary cerebrocortical cells: Role of thyroid hormone receptor subtypes and interactions with retinoic acid and glucocorticoids. *PLoS One*. 2014;9(3):1.
117. Flamant F, Koibuchi N, Bernal J. Editorial: “Thyroid hormone in brain and brain cells”. Vol. 6, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Research Foundation; 2015.
118. López-Espíndola D, Morales-Bastos C, Grijota-Martínez C, Liao XH, Lev D, Sugo E, et al. Mutations of the thyroid hormone transporter MCT8 cause prenatal brain damage and persistent hypomyelination. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014;99(12):E2799–804.
119. Bauer M, Goetz T, Glenn T, Whybrow PC. The thyroid-brain interaction in thyroid disorders and mood disorders. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(10):1101–14.

120. Ceresini G, Lauretani F, Maggio M, Ceda GP, Morganti S, Usberti E, et al. Thyroid function abnormalities and cognitive impairment in elderly people: Results of the invecchiare in chianti study. *J Am Geriatr Soc.* 2009;57(1):89–93.
121. Zeillhofer J, Saletub B, Staryc J, Ahmadià R. Cerebral Function in Hyperthyroid Patients Psychopathology, Psychometric Variables, Central Arousal and Time Perception before and after Thyreostatic Therapy. *Neuropsychobiology.* 1984;11:89–93.
122. Stern RA, Robinson B, Thorner AR, Arruda JE, Prohaska ML, Prange AJ. A Survey Study of Neuropsychiatric Complaints in Patients With Graves' Disease. *Journal of Neuropsychiatry.* 1996;8(2):181–5.
123. Denicoff KD, Joffe RT, Lakshmanan MC, Robbins J, Rubinow DR. Neuropsychiatric Manifestations of Altered Thyroid State. *Am J Psychiatry.* 1990;147:94–9.
124. Osterweil D, Syndulko K, Cohen SN, Pettler-Jennings PD, Hershman IM, Jeffrey Cummings SL, et al. Cognitive Function in Non-Demented Older Adults with Hypothyroidism. *Journal of American Geriatrics Society.* 1992;40:325–35.
125. Burmeister LA, Ganguli M, Dodge HH, Toczek T, Dekosky ST, Nebes RD. Hypothyroidism and Cognition: Preliminary Evidence for a Specific Defect in Memory. *THYROID.* 2001;11(12):1177–85.
126. Loosen PT. EFFECTS OF THYROID HORMONES ON CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN AGING. *Psychoneuroendocrinology.* 1992;17(4):355–74.
127. Gothié JD, Vancamp P, Demeneix B, Remaud S. Thyroid hormone regulation of neural stem cell fate: From development to ageing. *Acta Physiologica.* enero de 2020;228(1):e13316.
128. Farbood Y, Shabani S, Sarkaki A, Mard SA, Ahangarpour A, Khorsandi L. Peripheral and central administration of T₃ improved the histological changes, memory and the dentate gyrus electrophysiological activity in an animal model of Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis.* 2017;32(3):693–701.
129. González-Madrid E, Rangel-Ramírez MA, Opazo MC, Méndez L, Bohmwald K, Bueno SM, et al. Gestational hypothyroxinemia induces ASD-like phenotypes in behavior, proinflammatory markers, and glutamatergic protein expression in mouse offspring of both sexes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2024;15.
130. Chiaravalloti A, Ursini F, Fiorentini A, Barbagallo G, Martorana A, Koch G, et al. Functional correlates of TSH, fT₃ and fT₄ in Alzheimer disease: A F-18 FDG PET/CT study. *Sci Rep.* 2017;7(1):6220.

131. Quinlan P, Horvath A, Wallin A, Svensson J. Low serum concentration of free triiodothyronine (FT₃) is associated with increased risk of Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;99:112–9.
132. Quinlan P, Horvath A, Eckerström C, Wallin A, Svensson J. Altered thyroid hormone profile in patients with Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology*. 2020;121.
133. Abdul-Rahman SA, Aly W, Bastawy S. Dementia, Thyroid Function and Serum Level of S100B. *Life Sci J [Internet]*. 2013;10:2633–8.
134. Browning TB, Atkins RW, Weiner H. CEREBRAL METABOLIC DISTURBANCES IN HYPOTHYROIDISM: Clinical and Electroencephalographic Studies of the Psychosis of Myxedema and Hypothyroidism. *AMA Arch Intern Med [Internet]*. 1954;93(6):938–50.
135. Jelinek EH. Fits faints coma and dementia in Myxedema. *Lancet*. 1962;2(7264):1010–2.
136. Pilhatsch M, Marxen M, Winter C, Smolka MN, Bauer M. Hypothyroidism and mood disorders: Integrating novel insights from brain imaging techniques. *Thyroid Res*. 2011;4(SUPPL. 1).
137. Heyman A, Wilkinson WE, Hurwitz BJ, Schmechel D, Sigmon AH, Weinberg T, et al. Alzheimer's Disease: Genetic Aspects and Associated Clinical Disorders. *Ann Neurol*. 1983;14(5):507–15.
138. Aniello F, Couchie D, Bridoux AM, Gripoist D, Nunez J. Splicing of juvenile and adult tau mRNA variants is regulated by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:4035–9.
139. Latasa MJ, Belandia B, Pascual A. Thyroid Hormones Regulate B-Amyloid Gene Splicing and Protein Secretion in Neuroblastoma Cells. *Endocrinology*. 1998;139(6):2692–8.
140. Belandia B, Latasa MJ, Villa A, Pascual A. Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the β -amyloid precursor protein gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(46):30366–71.
141. van Osch LA, Hogervorst E, Combrinck M, David Smith A. Low thyroid-stimulating hormone as an independent risk factor for Alzheimer disease. *Neurology*. 2004;62:1967–71.
142. Chen JM, Huang CQ, Ai M, Kuang L. Circadian rhythm of TSH levels in subjects with Alzheimer's disease (AD). *Aging Clin Exp Res*. 2013;25(2):153–7.
143. Yong-Hong L, Xiao-Dong P, Chang-Quan H, Bo Y, Qing-Xiu L. Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in Patients With Alzheimer Disease (AD). *J Investig Med [Internet]*. 2013;61:578–81.

144. Kalmijn S, Mehta KM, Pols HAP, Hofman A, Drexhage HA, Breteler MMB, et al. Subclinical hyperthyroidism and the risk of dementia. The Rotterdam study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;53:733-7.
145. Ganguli M, Burmeister LA, Seaberg EC, Belle S, Dekosky ST. Association between A Community-Based Dementia and Study Elevated TSH. *Biol Psychiatry*. 1996;40:714-25.
146. Johansson P, Almqvist EG, Johansson JO, Mattsson N, Hansson O, Wallin A, et al. Reduced cerebrospinal fluid level of thyroxine in patients with Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(7):1058-66.
147. de Jong FJ, Masaki K, Chen H, Remaley AT, Breteler MMB, Petrovitch H, et al. Thyroid function, the risk of dementia and neuropathologic changes: The Honolulu-Asia Aging Study. *Neurobiol Aging*. 2009;30(4):600-6.
148. Davis JD, Podolanczuk A, Donahue JE, Stopa E, Hennessey J V, Luo LG, et al. Thyroid Hormone Levels in the Prefrontal Cortex of Post-Mortem Brains of Alzheimer's Disease Patients. *Curr Aging Sci*. 2008;1:175-81.
149. Kung Sutherland M, Wong L, Somerville MJ, Handley P, Yoong L, Bergeron C, et al. Reduction of Thyroid Hormone Receptor c-ERB mRNA Levels in the Hippocampus of Alzheimer as Compared to Huntington Brain. *Neurobiol Aging*. 1992;3:301-12.
150. Morreale de Escobar G, Escobar DE, Pastor R, Obregon MJ, Escobar F, Rey D. Effects of Maternal Hypothyroidism on the Weight and Thyroid Hormone Content of Rat Embryonic Tissues, before and after Onset of Fetal Thyroid Function. 1985;117(5):1890-900.
151. Grijota-Martínez C, Bárez-López S, Ausó E, Refetoff S, Frey WH, Guadaño-Ferraz A. Intranasal delivery of thyroid hormones in MCT8 deficiency. *PLoS One*. 2020;15(7).
152. Montero-Pedrazuela A, Grijota-Martínez C, Guadaño-Ferraz A, Bárez-López S. a Sensitive Radioimmunoassay for T3 and T4 Determinations in Plasma and Tissues. *En Methods Mol Biol*; 2025. p. 37-59.
153. Luo L, Yano N, Mao Q, Jackson IMD, Stopa EG. Thyrotropin releasing hormone (TRH) in the hippocampus of Alzheimer patients. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2002;4:97-103.
154. Annerbo S, Wahlund LO, Lökk J. The significance of thyroid-stimulating hormone and homocysteine in the development of Alzheimer's disease in mild cognitive impairment: A 6-year follow-up study. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2006;21(3):182-8.

155. Peeters RP, Visser TJ, Feingold K, Ahmed S, Anawalt B, Blackman MR. Metabolism of Thyroid Hormone. South Dartmouth (MA): Endotext; 2017.
156. Riese C, Michaelis M, Mentrup B, Götz F, Köhrle J, Schweizer U, et al. Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology*. 2006;147(12):5883–92.
157. Ain KB, Mori Y, Refetoff S. Reduced Clearance Rate of Thyroxine-Binding Globulin (TBG) with Increased Sialylation: A Mechanism for Estrogen-Induced Elevation of Serum TBG Concentration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1987;65(4):689–96.
158. Tahboub R, Arafah BM. Sex steroids and the thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. diciembre de 2009;23(6):769–80.
159. Arafah BM. Decreased Levothyroxine Requirement in Women with Hypothyroidism during Androgen Therapy for Breast Cancer. *Ann Intern Med* [Internet]. 1994;121:247–51.
160. Ambrosino I, Vacante M, Politi C, Barbagelata E, Ciarambino T. Sexual differences regarding Alzheimer's disease: A narrative review. *Journal of Gerontology and Geriatrics*. 2020;68(3):168–73.
161. Eimer WA, Vassar R. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A β 42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener*. 2013;8(2).
162. Girard SD, Baranger K, Gauthier C, Jacquet M, Bernard A, Escoffier G, et al. Evidence for early cognitive impairment related to frontal cortex in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2013;33(3):781–96.
163. Sampaolo S, Campos-Barros A, Mazziotti G, Carlomagno S, Sannino V, Amato G, et al. Increased cerebrospinal fluid levels of 3,3',5'- triiodothyronine in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005;90(1):198–202.
164. Thompson CC, Bottcher MC. The product of a thyroid hormone-responsive gene interacts with thyroid hormone receptors. *Biochemistry* [Internet]. 1997;94:8527–32.
165. Potter GB, Beaudoin GMJ, DeRenzo CL, Zarach JM, Chen SH, Thompson CC. The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor. *Genes Dev*. 2001;15(20):2687–701.
166. Salas-Lucia F, Bianco AC. T₃ levels and thyroid hormone signaling. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13(1044691).

167. Alzoubi KH, Gerges NZ, Alkadhi KA. Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of LTP of hippocampal CA1: Electrophysiological and molecular studies. *Exp Neurol*. 2005;195(2):330–41.
168. Chaalal A, Poirier R, Blum D, Laroche S, Enderlin V. Thyroid Hormone Supplementation Restores Spatial Memory, Hippocampal Markers of Neuroinflammation, Plasticity-Related Signaling Molecules, and β -Amyloid Peptide Load in Hypothyroid Rats. *Mol Neurobiol*. 2019;56(1):722–35.
169. Sepúlveda P, Ferreira AFF, Sandoval C, Bergoc G, Moreno ACR, Nunes MT, et al. Thyroid Hormone Supplementation Restores Cognitive Deficit, Insulin Signaling, and Neuroinflammation in the Hippocampus of a Sporadic Alzheimer's-like Disease Rat Model. *Cells*. 2024;13(21).

13. ANEXOS

13.1 ANEXO 1: ACTA DE APROBACIÓN CICUAL-UV Y DIRECCIÓN GENERAL DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN DE LA COMUNIDAD DE MADRID



ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA CÓDIGO: BEA193-23

El **Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Valparaíso (CICUAL-UV)**, con fecha **27 de abril de 2023** declara haber evaluado el siguiente protocolo experimental:

INVESTIGADOR RESPONSABLE	:	Dra. Daniela López Espíndola
TÍTULO DEL PROYECTO	:	Rol de las hormonas tiroideas en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad de Alzheimer y sus potenciales implicancias terapéuticas.
FINANCIAMIENTO	:	FONDECYT DE INICIACIÓN 2023
CÓDIGO DEL PROYECTO	:	N°11230727
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	:	BEA193-23

Para su evaluación, el Comité revisó los antecedentes presentados en el formulario **CICUAL-F-01-FORMULARIO DE SOLICITUD DE APROBACIÓN PARA INVESTIGACIÓN EN ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN** y que se señalan en las páginas anexas a esta acta. En la valoración bioética, el Comité consideró procedentes los aspectos indicados en el formulario y estima que no hay objeciones para el uso de animales propuesto en este proyecto. Por lo anterior, el **Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio aprueba este protocolo experimental por la duración total del proyecto a contar de la fecha de aprobación.**

El **Investigador Responsable** se debe asegurar que todas las personas involucradas en el protocolo e individualizadas en el formulario de solicitud se hayan capacitado en la realización de los procedimientos indicados en éste. Además, debe considerar los siguiente:

- Si requiere cambiar cualquier aspecto de este estudio, como objetivos, personal, patrocinadores, procedimientos, entre otros, deberá enviar una **SOLICITUD DE ENMIENDA (CICUAL-F-05-FORMULARIO)** al correo cicual@uv.cl. Los cambios solicitados no se deben iniciar hasta que el CICUAL-UV no haya aprobado la enmienda.
- Al inicio del último año del proyecto, el Investigador Responsable deberá enviar una **SOLICITUD DE SEGUIMIENTO (CICUAL-F-03-FORMULARIO)** al correo cicual@uv.cl. Sin perjuicio de lo anterior, CICUAL-UV podrá solicitar seguimiento a su proyecto en cualquier momento del mismo.
- El último trimestre del proyecto, el Investigador Responsable deberá enviar una **SOLICITUD DE CIERRE (CICUAL-F-11-FORMULARIO)** al correo cicual@uv.cl. Una vez emitida el acta de cierre, el Investigador Responsable no podrá utilizar más animales asociados al proyecto de investigación.
- Es deber del Investigador Responsable, mantener actualizados los registros de procedimientos realizados con animales. Estos serán revisados por el CICUAL-UV en las actividades de seguimiento del protocolo aprobado.
- El no cumplimiento de este protocolo puede significar que el proyecto no obtenga el cierre oficial por parte de CICUAL-UV, imposibilitando al Investigador Responsable a postular y adjudicar otro fondo de financiamiento para investigación.



Dr. Ramón Sotomayor Zárate
Instituto De Fisiología
Facultad De Ciencias
Universidad Valparaíso
Presidente CICUAL-UV



Montaña 885, Viña del Mar | Fono: +56 (32) 250 7000 | E-mail: cicual@uv.cl |



Dirección General de Agricultura,
Ganadería y Alimentación
CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE,
AGRICULTURA E INTERIOR

Vista la solicitud presentada por ANA CRISTINA GUADAÑO FERRAZ, para la autorización del proyecto de memoria técnica titulada "ROLE OF THYROID HORMONES IN THE PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF ALZHEIMER'S DISEASE AND ITS POTENTIAL THERAPEUTIC IMPLICATIONS" y duración de 3 AÑOS, a desarrollar en el centro usuario IIB ALBERTO SOLS-CSIC con código de registro ES280790000188 y siendo el responsable del proyecto ANA CRISTINA GUADAÑO FERRAZ.

Visto el informe favorable del Área de Protección Animal de la Subdirección General de Producción Agroalimentaria.

Considerando que el citado proyecto se ajusta a lo establecido en el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: **autorizar la realización del proyecto referenciado** con una **duración de 3 AÑOS desde la fecha de esta resolución**, siempre que se mantengan las condiciones del centro usuario, las que dieron lugar a la autorización y que el personal que intervenga tenga la preparación y formación adecuada que se especifica en el citado Real Decreto y cuente con la capacitación para ejercer las funciones que va a desarrollar en las especies que se van a utilizar en el proyecto. El régimen de sanciones e infracciones de lo previsto en este real decreto se regirá por lo previsto en la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, de protección de los animales en su explotación, transporte, experimentación o sacrificio, y en la normativa autonómica de aplicación, sin perjuicio de las responsabilidades civiles, penales o de otro orden que pudieran concurrir.

Tal y como se establece en el informe de evaluación aportado, este proyecto no deberá ser sometido a la realización de una evaluación retrospectiva.

Contra esta Resolución, que no agota la vía administrativa, cabe interponer recurso de alzada en el plazo de un mes, contado desde el día siguiente a la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente, Agricultura y Ordenación del Territorio, conforme a lo establecido en el artículo 121 y siguientes de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas.

Madrid, a fecha de la firma
EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN
(P.D.F. Resolución de 18 de noviembre de 2021)
EL SUBDIRECTOR GENERAL DE PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA
(Documento firmado electrónicamente. Huella de firma en el lateral)

Ref.: PROEX 282.4/23

Firmado digitalmente por: CARPINTERO HERVAS JESUS
Fecha: 2023.11.02 15:12



La autenticidad de este documento se puede comprobar en www.madrid.org/conse mediante el siguiente código seguro de verificación: **1202512683139945610018**

13.2 ANEXO 2: ACTA DE CERTIFICACIÓN COMITÉ DE BIOSEGURIDAD DE LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO



Vicerrectoría de Investigación e Innovación
Comité de Bioseguridad

**CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD
BS05-23**

El Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso, declara que, evaluó el protocolo experimental del Proyecto Fondecyt de Iniciación 11230727, financiado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), titulado "**ROLE OF THYROID HORMONES IN THE PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF ALZHEIMER'S DISEASE AND ITS POTENTIAL THERAPEUTIC IMPLICATIONS**", presentado por la investigadora responsable Daniela López Espíndola, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

- I. Para su evaluación el Comité de Bioseguridad revisó los antecedentes presentado por el interesado en relación a los riesgos y medidas preventivas de las actividades planteadas en el proyecto referido, aquellas actividades se realizarán en los Laboratorios de Ciencias Morfológicas, Investigaciones Biomédicas, Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas, Laboratorio de Sinaptopatías, de la Escuela de Medicina, Edificio Bruno Gunther, Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.
- II. En la evaluación de Bioseguridad del proyecto, el Comité consideró apropiados el control de riesgos, las medidas preventivas, la gestión de residuos y el resguardo de la comunidad y del medio ambiente.
- III. Por lo anterior, el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso certifica que este protocolo experimental contempla las medidas de Bioseguridad definidas en el Reglamento de Higiene y Seguridad de la UV y en el Manual de Bioseguridad de CONICYT.
- IV. Se extiende este certificado para ser presentado a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID).

ANGELA HERRERA PAREDES
PRESIDENTA
COMITÉ BIOSEGURIDAD
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO



VALPARAÍSO, marzo de 2023.