



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

El déficit cognitivo y la enfermedad de Alzheimer en presencia de alteraciones metabólicas

Estudio *in vivo* de una nueva diana terapéutica
y de la estrategia multidiana para el tratamiento
de estas condiciones

Triana Espinosa Jiménez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación
Departamento de Farmacología, Toxicología y Química
Terapéutica

Recerca, Desenvolupament i Control de Medicaments

El déficit cognitivo y la enfermedad de Alzheimer en presencia de alteraciones metabólicas

Estudio *in vivo* de una nueva diana terapéutica y de la estrategia multidiana
para el tratamiento de estas condiciones

Triana Espinosa Jiménez

2023



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación

Departamento de Farmacología, Toxicología y Química Terapéutica

Programa de doctorado en Recerca, Desenvolupament i Control de
Medicaments

El déficit cognitivo y la enfermedad de Alzheimer en presencia de alteraciones metabólicas

Estudio *in vivo* de una nueva diana terapéutica y de la estrategia multidiana
para el tratamiento de estas condiciones

*Memoria presentada por **Triana Espinosa Jiménez** para optar al título de
doctora por la Universidad de Barcelona*

Director

Directora

Estudiante de doctorado

Dr. Antoni Camins Espuny

Dra. Miren Ettcheto Arriola

Triana Espinosa Jiménez

Triana Espinosa Jiménez

Junio 2023

Esta tesis doctoral se ha llevado a cabo en el departamento de Farmacología, Toxicología y Química Terapéutica de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona y ha estado financiada por:



Institut de Neurociències
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Instituto de neurociencias



**EXCELENCIA
MARÍA
DE MAEZTU**

Universidad de Barcelona



**Generalitat
de Catalunya**

Generalitat de Catalunya

ciberMed

Centro de Investigación Biomédica en Red en
Enfermedades Neurodegenerativas



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA, INNOVACIÓN
Y UNIVERSIDADES

Ministerio de Ciencia, Innovación y
Universidades



Unión Europea

Fondo Europeo
de Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"

Fondo Europeo de Desarrollo Regional

*Somos lo que hacemos de forma repetida. La excelencia no
es un acto, sino un hábito.*

Aristóteles

Índice

Agradecimientos	xi
Resumen	xv
Lista de abreviaturas	xvii
Introducción	1
1. La demencia y la enfermedad de Alzheimer	3
1.1. Clasificación de la enfermedad.....	4
1.2. Epidemiología	5
1.3. Neuropatología de la EA	6
1.4. Eventos patogénicos de la EA	9
1.4.1. Acumulación del péptido A β	9
1.4.2. La proteína Tau en la EA	14
1.4.3. El papel del sistema colinérgico en la EA.....	17
1.4.4. Neuroinflamación	19
1.4.5. Alteración de las espinas dendríticas	33
1.5. Factores de riesgo de la EA.....	40
2. La EA y la diabetes mellitus	46
2.1. Diabetes mellitus	46
2.2. La glucosa en el cerebro	48
2.3. La insulina en el cerebro.....	50
2.3.1. La insulina	50
2.3.2. Funciones de la insulina en el SNC	52
2.3.3. El receptor de la insulina	54
2.4. DMT2 y EA	57
2.4.1. La EA como un nuevo tipo de diabetes: «Diabetes tipo 3».....	58
2.5. El receptor PPAR β/δ como nexo entre las alteraciones cognitivas y metabólicas	63
3. Tratamiento de la EA	65

3.1. Terapias actuales de la EA.....	65
3.1.1. Inhibidores de la AChE.....	66
3.1.2. Antagonistas de los receptores NMDA: Memantina	68
3.1.3. Nuevas terapias: Aducanumab, Lecanemab y oligomanato sódico	70
3.2. Las moléculas multidiana como nueva estrategia para el tratamiento de la EA: Rheina-Huprina.....	73
4. Modelos experimentales de ratón para el estudio del déficit cognitivo y la EA en presencia de alteraciones metabólicas	79
Hipótesis y objetivos.....	85
Resultados	89
Publicación I	91
Publicación II	111
Discusión	135
Estudio del papel del receptor PPAR β/δ en el desarrollo de alteraciones cognitivas.....	139
Estudio del híbrido RHE-HUP como posible candidato para el tratamiento de la EA exacerbada por una dieta rica en grasa.....	148
Conclusiones	163
Bibliografía	167

Agradecimientos

Aunque es muy difícil plasmar en papel todo el agradecimiento que siento ahora mismo, me gustaría intentar expresar lo importante que ha sido su apoyo a toda esa gente que me ha acompañado en este largo camino.

En primer lugar, gracias a mis directores de tesis, el Dr. Antoni Camins y la Dra. Miren Ettcheto. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de este gran grupo y por toda la ayuda recibida. Como no, también me gustaría agradecer a mis compañeras de grupo: Laura, Marina y Mireia. Gracias por estar siempre dispuestas a ayudar y por intentar solucionar todos los dramas que me han ido surgiendo, que no han sido pocos. También, me gustaría agradecer a la Dra. Ester Verdaguer por el apoyo cada vez que he tenido que llevar a cabo algún experimento en el que ella podía ayudarme. Gracias por sacar siempre un hueco para enseñarme a pesar de tener mil cosas que hacer y gracias también por la paciencia con mis infinitas dudas.

A pesar de que ya no esté en España y de haber volado lejos para seguir creciendo como el gran investigador que es, no puedo olvidarme de Oriol, mi primer mentor. Gracias por enseñarme que este mundo te puede hacer crecer en tan gran medida, tanto personal como laboralmente. Gracias por enseñarme tantísimo y por confiar en mí más de lo que yo misma lo hacía cuando empecé. Sentaste los cimientos para poder llegar a donde estoy hoy, y siempre te estaré agradecida por ello.

Me gustaría continuar agradeciendo a una persona que ha llegado en los últimos meses de este camino, mi alumna Alba. No sé ni por dónde empezar a enumerar todo lo que me has ayudado en este último tramo. Siempre me han dicho que el tiempo en el que estás escribiendo la tesis es el peor (incluso hay gente que me ha llegado a decir que ha sido el peor de su vida), pero este no

ha sido mi caso, y ha sido así en gran medida gracias a ti. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudar, a quitarme trabajo. Gracias por tu alegría, por tu cariño y, sobre todo, gracias por haber roto esa relación doctoranda-alumna, para convertirla en una relación de equipo. Gracias por hacerme sentir que no estaba sola, y que entre las dos lo sacaríamos todo hacia delante.

Y ahora sí, comienzo a agradecer a todas las personas que están al pie del cañón cada día haciendo que el mundo de la investigación siga hacia delante. Gracias Júlia *pequeña*, Alba, Tere, Roger, Núria y Pol. Gracias por vuestras eternas palabras de ánimo, por vuestra disposición a ayudar siempre cuando algo no salía y no sabía por qué, por vuestra alegría y por vuestras risas. Hacéis que el laboratorio sea un lugar menos duro. En concreto, dentro de este grupo, quiero destacar a las que más que compañeras se han convertido en amigas: Aina, Edurne, Júlia y Vero. Vosotras habéis sido la razón por la que un lunes después de vacaciones no ha sido tan duro volver a trabajar. Gracias por hacer mis problemas vuestros, por el apoyo y la alegría infinita. Gracias por las charlas y las risas en el pasillo, gracias por las interminables comidas riéndonos y sintiéndome en casa. Gracias por poder contaros absolutamente todo y estar ahí para escucharme. En definitiva, gracias por hacerme sentir tan querida y por dejarme ser yo completamente.

Y para acabar con el mundo del laboratorio a lo grande, como es él, mi Javi. ¿Qué te digo a ti que no sepas ya de sobra? GRACIAS, sí, en mayúsculas. Gracias por ser mi mejor amigo, mi familia. Gracias por no dejarme sola jamás. Por prácticamente haberte sacado un doctorado en neuro por ayudarme. Por ser mi equipo, mi apoyo, mi profesor, mi psicólogo, mi amigo, mi ayudante. Gracias por ser como eres, por tener un corazón tan grande, por ayudar tan desinteresadamente a todo el mundo, por hacerme reír tantísimo (a mí y a todas) y por escucharme incluso cuando tú mismo no estabas en tu mejor

momento. Siempre tendrás un hueco especial en mi corazón y el doctorado ha sido solo la primera de las muchas aventuras que nos quedan juntos.

Me gustaría continuar agradeciendo a mi familia. Gracias a mi tía, a mi tita y a mi tío. Gracias por preguntarme siempre cómo estoy y cómo lo llevo a pesar de no tener ni idea (todavía) de qué es lo que hago. Gracias por seguir preocupándoos por mí a pesar de ser un desastre y no llamar nunca. Pero, en especial, quiero agradecer a mi padre y a mi madre. Vosotros sí que sois la razón de que yo haya llegado donde estoy. Gracias por creer siempre en mí, por escucharme, aunque fuese por teléfono, y por apoyarme en todo lo que me propongo. Pero todo lo que tengo que agradecer viene de mucho antes del doctorado. Gracias por enseñarme que no hay que rendirse, por inculcarme la perseverancia y el trabajo duro. Gracias por las interminables horas preguntándome antes de los exámenes, gracias por la paciencia cuando en casa no se podía ni escuchar un ruido porque yo estaba estudiando. Gracias por empujarme a seguir siempre que he dicho que no podía más. Si he llegado a estar escribiendo estas páginas y estar a punto de entregar mi tesis doctoral, es gracias a todo lo que me queréis y todo lo que me habéis enseñado.

Gracias también a mi mejor amiga, Cristina. Gracias por, a pesar de estar en la otra punta del país, hacerme sentir tu amistad y por ser mi apoyo desde que te conocí a los once años. Gracias también por sacar tiempo de donde no lo tienes para maquetar y poner tu granito de arena en este reto tan importante para mí. No sabes lo feliz que me hace que estés presente de esta manera en mi tesis.

Para terminar, y de forma muy importante y especial, agradecerte Paul todo lo que has hecho y haces por mí. Gracias por tu apoyo incondicional, día a día. Gracias por escucharme hablar de experimentos cuando no entendías nada. Gracias por tu paciencia, tu amor, por ser tan comprensivo y por darme exactamente lo que he necesitado en cada momento. Gracias por hacer que

todo sea más fácil y por creer siempre en mí, pase lo que pase. En definitiva, gracias por quererme tanto y tan bien. Te quiero.

Y, por último, y no por ello menos importante, quiero darme las gracias a mí misma. Gracias por no haberte rendido, por haber seguido peleando a pesar de creer que no podías más. Lo hemos conseguido. Ahora, a por lo siguiente que venga.

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más común. En los últimos años su prevalencia se ha incrementado preocupantemente, considerándose la epidemia del siglo XXI. Hasta ahora solo se han conseguido desarrollar fármacos capaces de retrasar el avance de la enfermedad, pero ninguno de ellos ha sido capaz de curarla. Esto podría deberse a que la patofisiología de la EA comienza décadas antes de que aparezcan los síntomas clínicos, por lo que la intervención terapéutica en la fase de demencia es demasiado tardía. Por otro lado, diferentes estudios han relacionado el consumo de una dieta rica en grasa, la cual puede llevar a obesidad y a diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), con un mayor riesgo de desarrollar EA. Sin embargo, las vías moleculares que relacionan ambas patologías todavía no han sido descritas completamente, necesiéndose nuevas investigaciones sobre posibles mecanismos que relacionen las alteraciones metabólicas y las cognitivas.

Por ello, el primer estudio de esta tesis estuvo centrado en conocer el papel del receptor PPAR β/δ en el desarrollo del déficit cognitivo y las consecuencias de su asociación con una dieta rica en grasa, pudiendo representar una interesante diana para el control de la EA antes de su aparición. Este estudio se llevó a cabo en ratones PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ de seis meses de edad alimentados con una dieta rica en grasa. En él, se demostró que estos ratones presentaban una disminución del número de espinas dendríticas y marcadores sinápticos, hechos que fueron acompañados por la alteración de la memoria. Además, también se observó un aumento de la activación astrocítica y microglial, junto con un aumento de biomarcadores neuroinflamatorios. Asimismo, este estudio mostró una alteración de la vía del receptor de la insulina a nivel hipocampal. Interesantemente, mientras que algunas alteraciones causadas por la falta del receptor PPAR β/δ no se vieron afectadas por la alimentación con la dieta rica

en grasa, otras sufrieron una exacerbación o necesitaron la combinación de ambos factores.

Por otro lado, la EA se caracteriza por su carácter multifactorial en la que numerosas vías moleculares se ven afectadas. Por este motivo, el desarrollo de moléculas multidiana está tomando más protagonismo, y en la segunda parte de la presente tesis se estudió el fármaco multidiana rheina-huprina (RHE-HUP), inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChE) y de la agregación de Tau, como posible tratamiento de la EA exacerbada por una dieta rica en grasa. En este trabajo, la inyección intraperitoneal de esta molécula a ratones hembra APP/PS1 de seis meses de edad alimentados con una dieta rica en grasa redujo los principales eventos característicos de la EA, incluyendo la hiperfosforilación de Tau, los niveles de A β ₄₂ y la formación de placas. Todo ello fue acompañado de un aumento de diferentes proteínas sinápticas y factores neurotróficos y de un incremento del número de espinas dendríticas, lo que resultó en una mejora de la memoria. Es de destacar que la mejora observada en este modelo puede ser atribuida directamente a una regulación a nivel central, ya que no se observaron modificaciones de las alteraciones periféricas originadas por la dieta rica en grasa. En resumen, esta tesis doctoral demuestra que la falta del receptor PPAR β/δ a nivel cerebral constituye no solo un nuevo factor de riesgo para la pérdida cognitiva en desórdenes neurológicos, sino que también se trata de una proteína clave dirigida a las vías fundamentales que conducen al deterioro de la memoria y a la EA, y que el fármaco RHE-HUP es un posible candidato para el tratamiento de la EA, incluso en presencia de alteraciones metabólicas, gracias al efecto observado en la mejora de algunos de los eventos neuropatológicos más importantes de esta enfermedad.

Lista de abreviaturas

Ach: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

ADAM10: Del inglés *A disintegrin and metalloproteinase 10*

AGEs: Del inglés *advanced glycation endproducts*

AICD: Fragmento C-terminal intracelular

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

AMPA: Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

APOE: Apolipoproteína E

APP: Del inglés *amyloid precursor protein*

APP-CTF: Fragmento C-terminal

A β : β -amiloide

A β Os: Oligómeros solubles de A β

BACE1: Del inglés *beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*

BDNF: Del inglés *brain derived neurotrophic factor*

BHE: Barrera hematoencefálica

BuChE: Butirilcolinesterasa

CaMK-II: Del inglés *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*

CAS: Sitio aniónico catalítico

CDK5: Del inglés *cyclin dependent kinase 5*

ChAT: Del inglés *choline acetyltransferase*

CREB: Del inglés *c-AMP response element-binding*

DBN1: Drebrina

DM: Diabetes mellitus

DMT1: Diabetes mellitus tipo 1

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2

EA: Enfermedad de Alzheimer

EMA: Del inglés *European Medicine Agency*

ERK: Del inglés *extracellular signal-regulated kinase*

F-actina: Actina filamentosa

FDA: Del inglés *Food and Drug Administration*

GFAP: Del inglés *glial fibrillar acidic protein*

GLUT1: Del inglés *glucose transporter protein type 1*

GSK3 β : Del inglés *glycogen synthase kinase 3 β*

IDE: Del inglés *insuling degrading enzyme*

IGF-R: Del inglés *insulin-like growth factor 1 receptor*

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-6: Interleucina 6

IRS: Del inglés *insulin receptor substrate*

JNK: Del inglés *Jun N-terminal kinase*

LPS: Lipopolisacárido

LTD: Del inglés *long term depression*

LTP: Del inglés *long term potentiation*

MAPK: Del inglés *mitogen-activated protein kinase*

MAPs: Del inglés *microtubule-associated protein*

MCI: Del inglés *mild cognitive impairment*

MWM: Del inglés *Morris Water Maze*

NEP: Neprilisina

NFK β : Del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhacer of activated B cells*

NMDA: N-metil-D-aspartato

NORT: Del inglés *novel object recognition test*

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONF: Ovillos neurofibrilares

PAS: Sitio aniónico periférico

PET: Del inglés *positron emission tomography*

PI3K: Del inglés *phosphotidyl inositol 3-kinase*

PIP2: Fosfatidil inositol 3,4 difosfato

PIP3: Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato

PKA: Del inglés *protein kinase A*

PKB: Del inglés *protein kinase B*

PPARs: Del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor*

PPRE: Del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor element*

PS: Placas seniles

PSD95: Del inglés *post synaptic density protein 95*

PSEN: Presenilina

PTP1B: Proteína tirosina fosfatasa 1B

RHE-HUP: Rheina-huprina

RI: Receptor de la insulina

RXR: Del inglés *retinoid X receptor*

sAPP: Fragmento amino-terminal soluble del APP

SNC: Sistema nervioso central

TLR4: Del inglés *toll-like receptor 4*

TNF- α : Del inglés *tumor necrosis factor α*

Trkb: Del inglés *tropomyosin receptor kinase B*

INTRODUCCIÓN

1. La demencia y la enfermedad de Alzheimer

«Demencia» originalmente significa «fuera de la mente de uno mismo», del latín *de* (fuera de) y *mens* (la mente). Al comienzo del siglo XIX, Esquirol definió la demencia teniendo en cuenta no solo las características cognitivas del trastorno, con deterioro de la memoria y del pensamiento en la vida cotidiana, sino también sus otras manifestaciones, como la apatía, el deterioro del comportamiento social, agresividad ocasional, iras delirantes y alucinaciones (Pinel, 1806). Esto deja patente lo extendidos que están los cambios en el cerebro, y que el impacto de la demencia en las personas, las familias y las comunidades es muy profundo. Por todo ello, hay que destacar la importancia de no solo tratar efectivamente esta condición, sino también de prevenirla.

La demencia, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se define como un síndrome –generalmente de naturaleza crónica o progresiva– caracterizado por el deterioro de la función cognitiva más allá de lo que podría considerarse una consecuencia del envejecimiento normal. La demencia afecta a la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio, entre otros. Sin embargo, la conciencia no se ve afectada. El deterioro de la función cognitiva suele ir acompañado, y en ocasiones es precedido, por el deterioro del control emocional, el comportamiento social o la motivación.

Las formas de demencia son múltiples y diversas. La más común de todas ellas es la enfermedad de Alzheimer (EA), ya que se calcula que representa entre un 60 % y un 70 % de los casos (Crous-Bou et al., 2017; Lane et al., 2018). Pero existen otras formas frecuentes de demencia como son: la demencia vascular, la demencia por cuerpos de Lewy y un grupo de enfermedades que pueden

contribuir a la demencia frontotemporal (degeneración del lóbulo frontal del cerebro) (Dening & Sandilyan, 2015). Los límites entre las distintas formas de demencia son difusos y muchas veces coexisten formas mixtas (James et al., 2012; Kapasi et al., 2017).

Tal y como se acaba de señalar, la EA es la causa de demencia más común en los ancianos. Es un trastorno neurodegenerativo progresivo que va privando al paciente de su función cognitiva, y, finalmente, causa la muerte (Blass & Gibson, 1991; J. L. Cummings & Cole, 2002).

La EA fue descrita por Alois Alzheimer en 1906 gracias a Auguste Deter, una paciente que a la edad de 51 años ingresó en el Hospital de Frankfurt debido a un llamativo cuadro clínico caracterizado por una pérdida rápida y progresiva de la memoria además de alucinaciones, desorientación, paranoia, trastornos de la conducta y un grave trastorno del lenguaje. La enferma murió tras permanecer cuatro años y medio hospitalizada. En la etapa final se encontraba completamente apática y confinada en la cama en posición fetal, incontinente, y, finalmente, aparecieron úlceras de decúbito y neumonía, que fueron las verdaderas causas de su muerte. Tras esta, Alois Alzheimer estudió el cerebro, describiendo la presencia de placas seniles (PS), ovillos neurofibrilares (ONF) y cambios ateroscleróticos cerebrales (Davies et al., 1980; Guerra et al., 2014).

1.1. Clasificación de la enfermedad

La EA puede ser clasificada atendiendo a diferentes criterios. En este caso nos centraremos en la clasificación según la implicación del factor genético, distinguiendo la forma familiar y la idiopática.

Enfermedad de Alzheimer familiar

La EA familiar, o también conocida como EA temprana, es una forma de la enfermedad poco común. De hecho, corresponde a menos de un 3 % del total de casos y afecta a personas de menos de 65 años, que además presentan un historial positivo de demencia en su familia (Lista et al., 2015; L. Wu et al., 2012). Aunque clínicamente no existen grandes diferencias con la forma esporádica, este tipo tiene una progresión mucho más rápida.

La EA familiar es heredada de forma autosómica dominante y puede afectar a tres genes: el gen que codifica para la proteína precursora amiloide (APP, del inglés *amyloid precursor protein*), Presenilina 1 (*PSEN1*) y Presenilina 2 (*PSEN2*) (Levy-Lahad et al., 1995; Lista et al., 2015; Piaceri et al., 2013). Estos genes están implicados en la formación de las placas de β -amiloide ($A\beta$) y en el procesamiento de la proteína transmembrana APP. Además, de los tres, las mutaciones que ocurren en *PSEN1* son más frecuentes que aquellas que ocurren en *APP* y *PSEN2*.

Enfermedad de Alzheimer idiopática

La EA idiopática, o de inicio tardío, constituye la forma más común de la enfermedad. Generalmente aparece a partir de los 65 años y se caracteriza porque, a pesar de que la edad constituye el principal factor de riesgo, se ha visto que elementos genéticos y medioambientales pueden también influir en las manifestaciones de la patología, como la dieta, la obesidad o el tabaquismo (Lista et al., 2015; Piaceri et al., 2013).

1.2. Epidemiología

El envejecimiento de la población se ha convertido en un fenómeno universal. Los informes del Programa de Naciones Unidas sobre el Envejecimiento y de

los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU. prevén que el número de personas de más de 65 años en el mundo pase de 420 millones en el año 2000 a casi 1 000 millones en el 2030, incrementando así la proporción de personas mayores del 7 % al 12 % (United Nations Ny. Department of Economic and Social Affairs, 2002). Debido a que la prevalencia de la EA está fuertemente asociada con la edad, se prevé que esta planteará enormes desafíos a los sistemas de salud pública y de atención a las personas mayores en todos los países del mundo. Actualmente, el número de pacientes con EA ronda los 26,6 millones de casos, llegando a cuadruplicarse en 2050 (C. Qiu, Kivipelto, & von Strauss, 2022). Este incremento del número de casos, el aumento de la esperanza de vida y la falta de tratamientos efectivos convierte a la EA en uno de los grandes problemas a los que deberán hacer frente los países a nivel mundial.

1.3. Neuropatología de la EA

A nivel macroscópico, el principal cambio observado en un cerebro con EA es la atrofia cortical bilateral y difusa. Las manifestaciones superficiales de la atrofia cortical incluyen el estrechamiento de los giros y el ensanchamiento de los surcos cerebrales. Además, también se produce una atrofia de las zonas hipocampal, parahipocampal y de la amígdala, acompañadas de una disminución del peso y del volumen cerebral. Aunque todas estas características son útiles en la evaluación inicial de los cerebros de pacientes con demencia, ninguna de ellas es específica de la EA. Por ello, se necesita una evaluación a nivel microscópico para su diagnóstico (DeTure & Dickson, 2019; Mott & Hulette, 2005).

A nivel microscópico, la EA se caracteriza principalmente por la acumulación de A β (constituido por 40-43 aminoácidos) en PS a nivel extracelular y de

hebras helicoidales de proteína Tau hiperfosforilada en ONF a nivel intracelular. La deposición de estos agregados proteicos va acompañada de respuestas moleculares y celulares complejas que dan lugar a fallo sináptico, neuroinflamación y, finalmente, muerte neuronal progresiva (Congdon & Sigurdsson, 2018) (Figura 1).

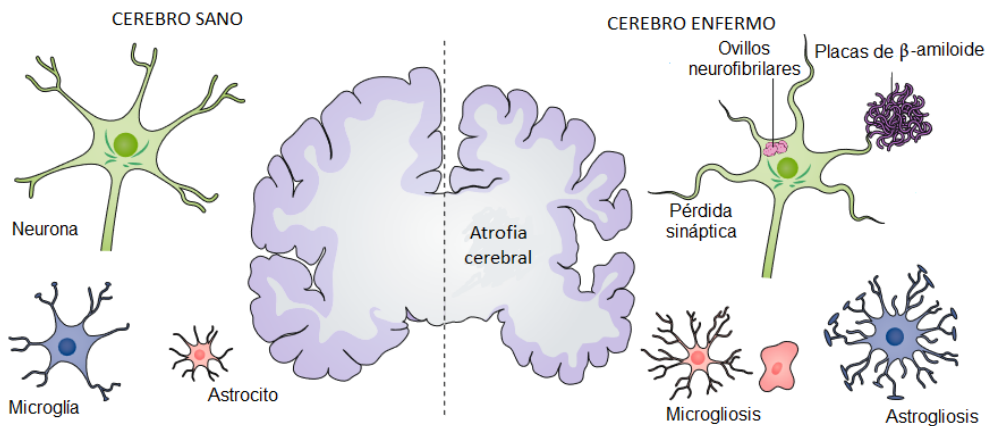


Figura 1. Principales eventos neuropatológicos de la EA. Fuente: Congdon & Sigurdsson, 2018 (Adaptado).

Sin embargo, se han encontrado PS y ONF en cerebros con un envejecimiento normal. En la cohorte de Nun Study, el 12 % de los participantes con una cognición intacta en el momento de la muerte presentaba una gran cantidad de PS y de ONF en el examen *post mortem* (Riley et al., 2005). Además, diferentes estudios han demostrado que la presencia de formas neurotóxicas solubles de $A\beta$ y Tau se correlacionaban en mayor medida con una alteración de la función sináptica y de la memoria que los propios ONF y PS (Z. Berger et al., 2007; Hampton et al., 2010; Z.-X. Wang et al., 2016). Esto sugiere que, aunque es probable que las PS y los ONF son instigadores de la enfermedad, otros mecanismos son directamente responsables de las respuestas del tejido cerebral, como por ejemplo la pérdida neuronal y sináptica, que en última

instancia resultan en cambios funcionales y deterioro de la cognición, característicos de la EA. De hecho, diversos estudios recientes han mostrado como la progresión de la pérdida cognitiva va más asociada a la pérdida sináptica y neuronal que a la propia presencia de PS y ONF, aumentando el protagonismo de las conexiones sinápticas en el desarrollo de la enfermedad (Herms & Dorostkar, 2016; C. K. Walker & Herskowitz, 2021).

Para añadir una mayor complejidad, estudios previos han demostrado que las características patofisiológicas de la EA comienzan décadas antes de que los síntomas clínicos se hagan patentes (Han et al., 2018; Sperling et al., 2011). Debido a la gran pérdida neuronal que se da en la fase de demencia, la intervención terapéutica para la EA en esta etapa es demasiado tardía: por ello, es importante buscar signos tempranos que ayuden a la profilaxis. Estas señales se buscan sobre todo en el deterioro cognitivo leve (MCI, del inglés *mild cognitive impairment*), la zona fronteriza entre el envejecimiento sano y la EA. Mientras que se sabe que esta última provoca daños irreversibles en el cerebro y compromete de forma inequívoca el funcionamiento cotidiano, el MCI se caracteriza por una relativa preservación de las capacidades cognitivas normales. De esta forma, los pacientes experimentan un cierto deterioro cognitivo, suficiente para que las actividades cotidianas exijan un mayor esfuerzo (Almeida & Radanovic, 2022), sin que haya evidencia de biomarcadores de la EA o siendo esta sea incierta (Dubois et al., 2010). A diferencia del MCI, la fase prodrómica de la EA se caracteriza porque, además de pérdidas de memoria episódicas que no se pueden considerar demencia, sí que aparecen biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo o de imagen, que muestran la presencia de cambios patológicos de la EA (Dubois et al., 2010; Han et al., 2018). Existen dos tipos principales de MCI: el MCI amnésico y el no-amnésico. Aquellos pacientes que presentan el tipo amnésico tienen un mayor riesgo de progresión a EA, mientras que aquellos con el tipo no-

amnésico podrían progresar hacia otras posibles demencias, como la demencia frontotemporal. No obstante, estos últimos presentan con frecuencia patología de EA y pueden acabar evolucionando a EA clínica (Han et al., 2018; Wolk & Vaishnavi, 2016). En definitiva, este periodo intermedio sin demencia es fundamental para que los médicos inicien el tratamiento y definan el diagnóstico y el pronóstico, logrando en el futuro, con un poco de suerte, disminuir la incidencia de la enfermedad.

1.4. Eventos patogénicos de la EA

En los más de ciento diez años transcurridos desde que se diagnosticó por primera vez la EA, se han propuesto muchos mecanismos patogénicos relacionados con la enfermedad. Sin embargo, casi todos los ensayos clínicos han fracasado en el intento de identificar algún tratamiento eficaz para pararla. Es por ello por lo que hoy en día coexisten numerosas hipótesis que intentan explicar los mecanismos patológicos de la EA, como son: el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la hipótesis glutamatérgica, la acumulación del péptido A β , la neuroinflamación, la hiperfosforilación de la proteína Tau, el papel del sistema colinérgico o la alteración de las espinas dendríticas. Esta tesis se centrará en las siguientes.

1.4.1. Acumulación del péptido A β

Las PS se forman debido a la sobreproducción y la acumulación del péptido A β (en concreto los péptidos A β ₄₀ y A β ₄₂). El A β ₄₂ resulta ser más hidrofóbico, mucho más insoluble y tiende a formar agregados, siendo el componente principal de las PS (Jarrett et al., 1993; Maccioni et al., 2001; T. Qiu et al., 2015). Estos péptidos se forman debido a la escisión de la proteína APP por distintas proteasas. La proteína APP es una proteína transmembrana tipo I, con el extremo amino-terminal orientado hacia el espacio extracelular y el extremo

carboxi-terminal orientado hacia el citosol. Se encuentra localizada en el cromosoma 21 y se expresa abundantemente en el cerebro, habiendo sido detectada también en otros tejidos (Müller et al., 2017; Nicolas & Hassan, 2014; Zheng & Koo, 2006).

Existen pruebas circunstanciales que apuntan a una serie de posibles funciones biológicas del APP, pero no se ha logrado definir claramente su mecanismo de acción (Dawkins & Small, 2014). Se ha observado que esta proteína podría tener un papel importante en el crecimiento y la proliferación celular, así como en el crecimiento de las neuritas y la sinaptogénesis. Por otro lado, dado que el APP se expresa en fases tempranas del desarrollo del sistema nervioso, está claro que podría desempeñar un papel clave en el crecimiento y la maduración de muchas células (Müller et al., 2017; Nicolas & Hassan, 2014; Reinhard et al., 2005).

En el procesamiento de esta proteína están implicadas tres proteasas denominadas α -, β - y γ -secretasa, en el cual se distinguen dos vías de procesamiento: la amiloidogénica y la no-amiloidogénica, claves en la formación del péptido A β y por lo tanto de las PS (Yuksel & Tacal, 2019).

Vía no-amiloidogénica

En esta vía, la proteína APP es escindida por la α -secretasa (ADAM10, del inglés *A disintegrin and metalloproteinase 10*) aproximadamente en la mitad de la región A β (en los residuos Lys 16 y Leu 17), evitando la formación del péptido A β (Esch et al., 1990; Postina, 2008; Sisodia et al., 1990). Este paso da lugar a un fragmento de 83 aminoácidos, denominado α CTF o C83, que queda anclado a la membrana plasmática, y al fragmento amino-terminal soluble del APP (sAPP α), que se libera al lumen extracelular. Se ha demostrado que este fragmento tiene un papel importante en la supervivencia neuronal y

en la plasticidad sináptica, demostrándose también que tiene una función protectora frente a la toxicidad inducida por el péptido A β (Dawkins & Small, 2014). Por otro lado, el fragmento α CTF es cortado por la γ -secretasa, liberando un fragmento de A β truncado denominado p3 (Barthet et al., 2012), en apariencia patológicamente irrelevante, y el fragmento C-terminal intracelular (AICD) (Barthet et al., 2012; Gu et al., 2001; Sastre et al., 2001), que es liberado al citosol y que podría estar implicado en la señalización nuclear (Cline et al., 2018; Viola & Klein, 2015) (Figura 2).

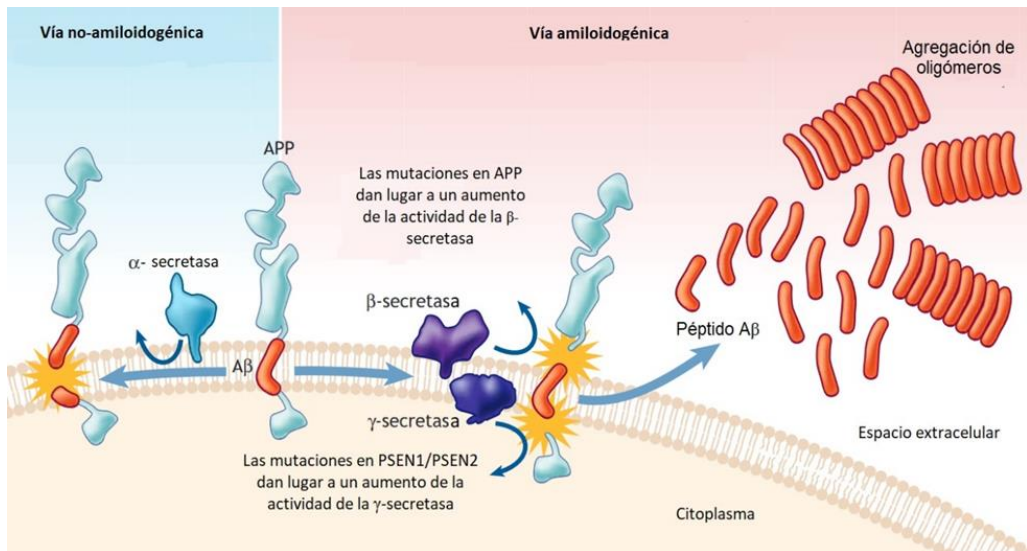


Figura 2. Esquema del procesamiento de la proteína APP. Fuente: Patterson et al., 2008 (Adaptado).

Vía amiloidogénica

La vía amiloidogénica es la responsable de la formación del péptido A β . En esta vía, el APP es procesada por la β -secretasa (BACE1, del inglés *beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*), que media el paso inicial y limitante de la producción de A β (Sathya et al., 2012; Vassar, 2004). Esta proteasa se expresa ubicuamente, encontrándose a niveles más elevados en el

cerebro y en el páncreas (Taylor et al., 2022). Debido a que el APP también se expresa a altos niveles en el cerebro, los niveles de estas dos proteínas convierten a este órgano en el principal tejido donde se encuentra una producción elevada de A β y ayuda a explicar por qué la EA es una enfermedad del cerebro a pesar de que el APP se exprese ubicuamente (Haass et al., 2012).

La actividad de BACE1 inicia la producción del péptido A β mediante el desprendimiento de una gran parte del ectodominio N-terminal soluble de APP (sAPP β). Esto genera un fragmento carboxi-terminal de APP de 99 aminoácidos (CTF β o C99), el cual queda anclado a la membrana. El sAPP β carece de la mayoría de los efectos neuroprotectores de sAPP α , ya que se ha demostrado que está críticamente involucrado en la pérdida de sinapsis durante el desarrollo de las neuronas centrales y periféricas (Furukawa et al., 1996; Koelsch, 2017; Nikolaev et al., 2009). Tras la actuación de BACE1, el fragmento que queda anclado a la membrana es cortado por la γ -secretasa, generando el péptido A β que puede ser de distintas longitudes, desde 38 a 43 aminoácidos. Los monómeros de A β se agregan fácilmente en medio acuoso, dando lugar a varios tipos de ensamblajes, incluyendo oligómeros (dímeros y trímeros solubles), protofibrillas y fibrillas amiloides (insolubles) (Seubert et al., 1992; Verma et al., 2015).

Como se ha mencionado previamente, numerosos estudios han demostrado una falta de correlación directa entre el número de PS y la pérdida sináptica en el estudio *post mortem* de cerebros con EA (Masliah et al., 1990, 1993; Sakono & Zako, 2010). Incluso otros estudios demostraron que los déficits cognitivos en modelos de ratones transgénicos de EA aparecieron previamente a la deposición de PS (Hsia et al., 1999; Mucke et al., 2000; Pelucchi et al., 2022). Todo ello ha generado que, actualmente, la hipótesis de que los oligómeros de A β (A β O) podrían tener un papel importante en la afectación de la memoria

e incluso que podrían estar detrás de la afectación sináptica, especialmente en estadios tempranos de la enfermedad, haya ganado una gran importancia (Hardy & Selkoe, 2002; Y. Huang & Liu, 2020; Klein et al., 2001; Lublin & Gandy, 2010; L. M. Smith & Strittmatter, 2017).

Como se ha podido observar con antelación, BACE1 podría ser una diana terapéutica importante, ya que su inhibición no solo reduce los niveles de A β , sino que evita la acumulación de CTF β , el cual contiene el dominio de A β y sirve como sustrato final para la producción de este péptido. Además, la acumulación de CTFs podría generar efectos tóxicos adicionales y poco conocidos (Citron, 2004; Schenk et al., 2012). Sin embargo, los inhibidores de BACE1 han fracasado en los ensayos clínicos, los cuales han tenido que ser interrumpidos debido a su toxicidad o empeoramiento de los síntomas cognitivos y de comportamiento (Imbimbo & Watling, 2019). No obstante, estos inhibidores se han centrado principalmente en la EA, y algunos de los efectos secundarios considerados indeseables en el tratamiento de esta enfermedad podrían ser beneficiosos en el tratamiento de la disfunción metabólica (Taylor et al., 2022). Por ejemplo, Verubecestat, el cual es un inhibidor de BACE1 probado en ensayos clínicos de fase 3 en pacientes con EA de leve a moderada, no mostró un efecto beneficioso sobre la cognición (Egan et al., 2018). Sin embargo, entre sus efectos adversos se describieron la disminución del peso corporal y la pérdida de apetito (Egan et al., 2019). Estos efectos considerados negativos en el tratamiento de la EA podrían ser enormemente beneficiosos para el tratamiento de las alteraciones metabólicas (Taylor et al., 2022).

El papel de esta secretasa en el metabolismo y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) ha sido apoyado por otros estudios (Dekeryte et al., 2021; Meakin et al., 2012, 2020), como el llevado a cabo por Plucińska y colaboradores, donde

la sobreexpresión neuronal de BACE1 en un modelo de ratón causó complicaciones diabéticas sistémicas (Plucińska et al., 2016). De esta forma, a pesar de que los mecanismos que subyacen a esta conexión no han sido dilucidados completamente, cada vez existen más pruebas del papel de BACE1 en el metabolismo.

Continuando con el papel de la vía amiloidogénica en la EA, ha surgido un nuevo concepto sobre la acumulación de A β . Se ha visto que el aclaramiento o degradación de este péptido tiene un papel más crítico en la acumulación de A β que su síntesis en sí, ya que los niveles basales de este péptido en el cerebro son el resultado del equilibrio dinámico entre la síntesis, recaptación y eliminación. Cualquier factor que resulte en una disminución del aclaramiento de A β , puede causar la acumulación de esta proteína (J Baranello et al., 2015; Yoon & Jo, 2012).

La eliminación puede ser llevada a cabo por distintos mecanismos enzimáticos, que involucran a distintas enzimas, como la neprilisina (NEP) o la enzima degradadora de insulina (IDE, del inglés *insuling degrading enzyme*), y no enzimáticos, como la captación por fagocitosis microglial o astrocítica o el transporte a los vasos sanguíneos mediado por receptores (Bohm et al., 2015; Kurochkin et al., 2018; Shibata et al., 2000; Sikanyika et al., 2019).

1.4.2. La proteína Tau en la EA

Hace más de un siglo, el descubrimiento realizado por Alois Alzheimer proporcionó las bases para una gran cantidad de estudios posteriores con el fin de elucidar el papel de esta proteína en la enfermedad. Sin embargo, el descubrimiento de que los componentes proteicos de los ONF eran formas hiperfosforiladas de Tau no llegó hasta la etapa de 1980 (KoSIK et al., 1986). La proteína Tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, del inglés *microtubule-associated protein*) y forma parte del

citoesqueleto de las células, expresándose principalmente en las neuronas y, en concreto, en los axones, aunque en las tautopatías se redistribuye hacia el soma y las dendritas (Goedert et al., 1989). Un solo gen codifica esta proteína, que genera seis isoformas diferentes, de 352 o 441 aminoácidos (Goedert, 2018; Mandelkow & Mandelkow, 1998). Esta proteína está implicada en varios procesos celulares, como la estabilización de microtúbulos, el mantenimiento axonal y el transporte intracelular (Guo et al., 2017; Kent et al., 2020; Y. Wang & Mandelkow, 2016). La fosforilación de Tau regula su actividad para unirse a los microtúbulos y estimular su ensamblaje. Un nivel normal de fosforilación es requerido para el correcto funcionamiento de esta proteína, mientras que el estado hiperfosforilado hace que pierda su actividad biológica. Además, la hiperfosforilación provoca la agregación de los filamentos cruzados helicoidalmente, que son los principales componentes de los ONF, caracterizándose por ser altamente insolubles y muy difíciles de eliminar (Medeiros et al., 2011).

Tau puede ser fosforilada en numerosos sitios distintos; de hecho, se han descrito alrededor de 85 lugares de fosforilación (serina, treonina y tirosina), teniendo cada uno de ellos un impacto diferente (Hu et al., 2016). Esta hiperfosforilación podría ser el resultado de una regulación al alza de las Tau cinasas o una regulación a la baja de las Tau fosfatasas (Y. Chen et al., 2014; Martin et al., 2011; Sontag & Sontag, 2014; Trojanowski & Lee, 1995). Numerosas de estas enzimas han sido evaluadas y aquellas que juegan un papel importante en la fosforilación de Tau en el cerebro incluyen a la proteína glucógeno sintasa cinasa 3 β (GSK3 β , del inglés *glycogen synthase kinase 3 β*), la cinasa ciclina-dependiente 5 (CDK5, del inglés *cyclin dependent kinase 5*), la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*), la proteína cinasa cAMP-dependiente (PKA, del inglés *protein kinase A*) y la proteína cinasa calcio/calmodulina-dependiente II

(CaMK-II, del inglés *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) (Cárdenas-Aguayo et al., 2014; Gong & Iqbal, 2008).

GSK3 β desempeña un papel importante en esta fosforilación, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, y se ha observado que esta cinasa puede fosforilar a Tau en Ser199, Thr231, Ser396, Ser400, Ser404, y Ser413, tanto *in vivo* como *in vitro* (F. Liu et al., 2002; Y. Zhang et al., 2018). Tras la hiperfosforilación de esta proteína, se produce su separación de los microtúbulos, la agregación en filamentos cruzados helicoidalmente, la ruptura del transporte intracelular y la degeneración de las neuronas (Maccioni et al., 2010; Noble et al., 2013). Como consecuencia de esta muerte neuronal, las formas oligoméricas y los filamentos de Tau se liberan al ambiente extracelular, contribuyendo a la activación de las células microgliales y estimulando el círculo vicioso que da lugar a la degeneración neuronal progresiva (Maccioni et al., 2010; Müller-Thomsen et al., 2020; Vogels et al., 2019) **(Figura 3)**.

Se han postulado muchas posibles causas que intentan explicar el porqué de estas fosforilaciones patológicas, como pueden ser: la presencia de especies reactivas de oxígeno; la activación de las células microgliales, lo que da lugar a la liberación de especies proinflamatorias, desencadenando cascadas de respuesta que acaban promoviendo la hiperfosforilación de Tau; los niveles de colesterol; y —lo más destacable— la presencia de oligómeros de A β , lo que supone un punto de unión entre ambos eventos patogénicos descritos hasta ahora (Alvarez et al., 2002; Hardy & Selkoe, 2002; Lloret et al., 2015; Maccioni et al., 2010).

Aunque numerosos compuestos se han desarrollado para atacar algunos puntos clave de este suceso patogénico —como son la reducción de la expresión de Tau, la inhibición de la agregación de esta proteína o la estabilización de los

microtúbulos, entre otros—, nuevamente ninguno de estos compuestos ha conseguido acabar con esta enfermedad (Congdon & Sigurdsson, 2018).

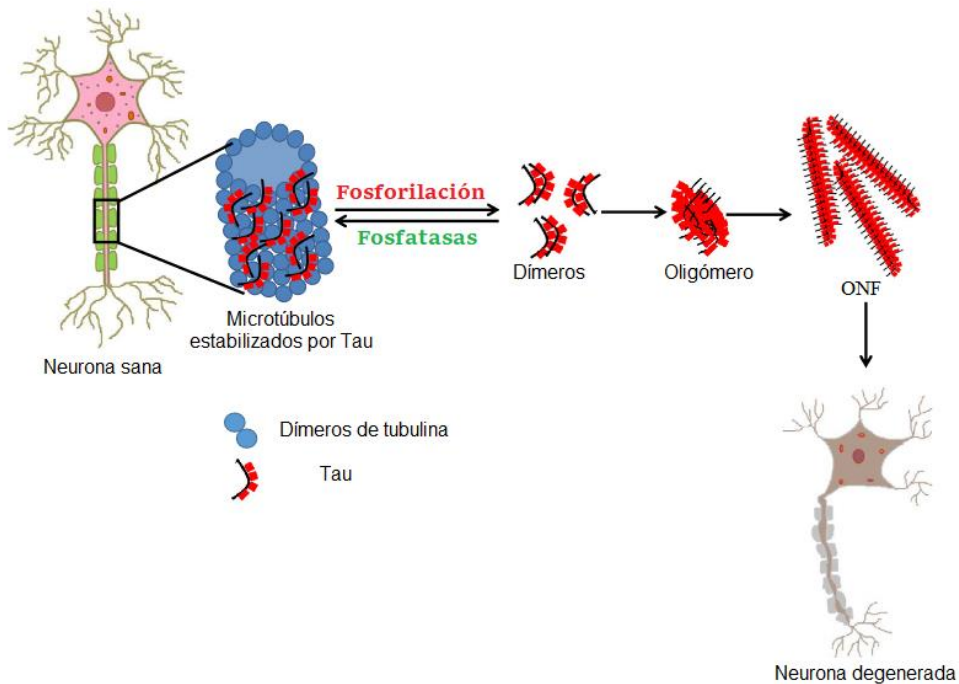


Figura 3: La hiperfosforilación de Tau. Fuente: Gorantla & Chinnathambi, 2018 (Adaptado).

1.4.3. El papel del sistema colinérgico en la EA

Las neuronas colinérgicas presinápticas son las responsables de la síntesis de la acetilcolina (ACh) gracias a la actividad de la acetilcolina transferasa (ChAT, del inglés *choline acetyltransferase*) a partir de colina y de acetil-CoA. La ACh es almacenada en vesículas y luego se libera a la hendidura sináptica, actuando sobre los receptores muscarínicos M1 y sobre los nicotínicos, en concreto en el receptor nicotínico $\alpha 7$, el cual está implicado en la mayoría de los efectos de la ACh sobre las funciones cognitivas (Wallace & Porter, 2011). Posteriormente, la ACh es hidrolizada por la acetilcolinesterasa (AChE), dando lugar a la colina y al acetato (Bertrand & Wallace, 2020; Schliebs & Arendt, 2011) (Figura 4).

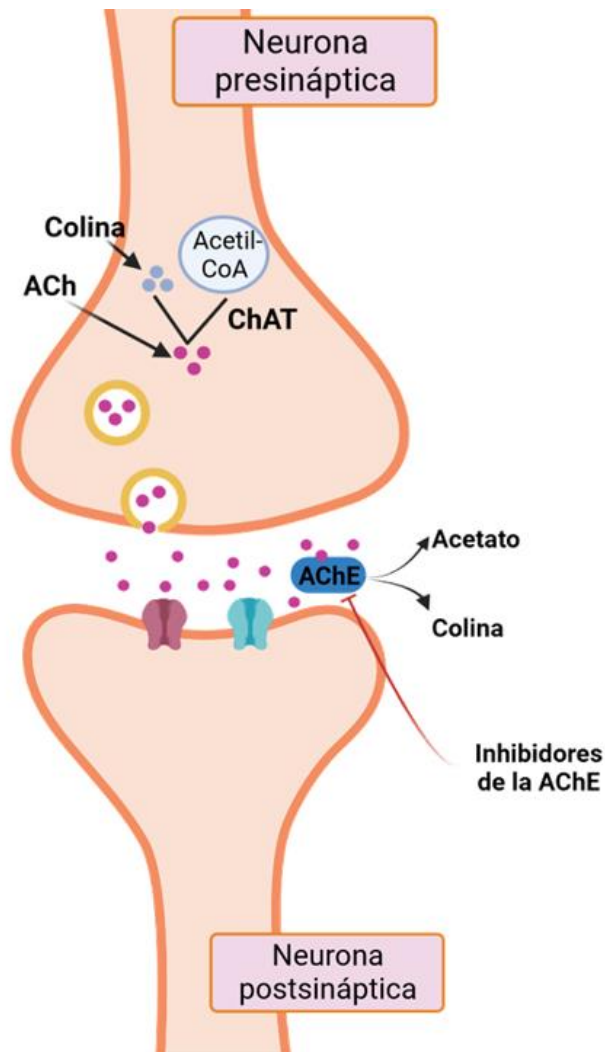


Figura 4: Esquema de la transmisión colinérgica.

El papel del sistema colinérgico en esta enfermedad está basado en la pérdida de actividad colinérgica comúnmente observada en los cerebros de pacientes con EA, en los que se observaron un déficit neocortical de ChAT, así como una reducción en la recaptación de la colina y de la liberación de ACh (Sanabria-Castro et al., 2017; Schaeffer & Gattaz, 2008). Todo ello, añadido a la evidencia existente del papel de la ACh en el aprendizaje y la memoria, es lo que llevó al abordaje de la enfermedad con fármacos que aumentasen la

concentración de ACh, impidiendo su degradación mediante la inhibición de la AChE, como son el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina (Davies & Maloney, 1976; Hampel et al., 2019; Perry et al., 1981). Sin embargo, el hecho de que estos fármacos no hayan podido frenar el desarrollo de la enfermedad y de que no se hayan encontrado alteraciones colinérgicas en paciente con MCI o con EA leve hace tambalear el papel de este sistema en la EA (Davis et al., 1999; DeKosky et al., 2002; Gilmor et al., 1999; P.-P. Liu et al., 2019).

Asimismo, se ha descrito una conexión clara entre el sistema colinérgico y el procesamiento de la proteína APP. Nitsch y colaboradores fueron los primeros en demostrar la regulación colinérgica del procesamiento de APP. Utilizando una línea celular embrionaria de riñón humano, demostraron que la activación de los receptores muscarínicos M1 no solo aumentaba los niveles de sAPP α , sino que también disminuía los niveles de A β (Nitsch et al., 1992). Además, también hay estudios que describen como la AChE precipita la formación de agregados tóxicos mediante la aceleración de la deposición del péptido A β y el incremento de su neurotoxicidad, contribuyendo a la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la disfunción sináptica (Alvarez et al., 2002; Inestrosa et al., 2005; Viayna et al., 2014). Todo ello muestra una conexión entre la toxicidad del A β y la hipofunción colinérgica, de manera que la administración de agonistas de los receptores colinérgicos o de inhibidores de la AChE no solo tiene efectos sobre el sistema colinérgico, sino que también son capaces de modular el procesamiento del APP mediante diferentes mecanismos.

1.4.4. Neuroinflamación

La neuroinflamación se define como la activación del sistema inmune innato del cerebro, y su principal función es proteger al sistema nervioso central (SNC) contra agentes infecciosos, lesiones o enfermedades (Spencer et al., 2012). Se trata de una respuesta compleja que implica una serie de cambios

celulares y moleculares, el reclutamiento de células inmunitarias periféricas, la inducción de algunas vías intracelulares y la liberación de mediadores inflamatorios en el cerebro. Todos estos factores pueden contribuir a la aparición de la disfunción y la muerte neuronal en la EA (Brown & Bal-Price, 2003; Calsolaro & Edison, 2016; McGeer & McGeer, 2010). Hasta hace relativamente poco, el SNC era considerado un órgano «inmunoprivilegiado» dotado de un pequeño número de células inmunitarias residentes (microglía) y una barrera hematoencefálica (BHE) eficaz, la cual se pensaba que actuaba como barrera impermeable a las células inmunitarias y a la mayoría de los factores difusibles producidos en la periferia (Arshavsky, 2006; Gebicke-Haerter et al., 1996; Mrass & Weninger, 2006).

Sin embargo, este dogma comenzó a ser cuestionado debido a que se ha observado que algunas células inmunes y proteínas están presentes en cerebros sanos (Kimmelberg, 2004; Kuehn, 2008). Actualmente, se considera que la BHE no es impermeable en condiciones fisiológicas y que su permeabilidad puede ser modificada por infecciones subclínicas, trauma, estrés y medicamentos, sugiriendo que se encuentra alterada en el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas (Popescu et al., 2009; Weiss et al., 2009; F. Zhang & Jiang, 2015). De esta forma, se está volviendo cada vez más evidente que moléculas del sistema inmune innato sistémico son capaces de estimular las células inflamatorias del SNC, así como de afectar directamente a las neuronas, lo que implica que una inflamación periférica puede desencadenar una respuesta neuroinflamatoria (Bell & Zlokovic, 2009; Cabrera-Pastor et al., 2019; Eikelenboom et al., 2006; Hays, 1998; Saito & Saido, 2018).

Independientemente de que la neuroinflamación provenga del mismo SNC o de la periferia, en general una respuesta neuroinflamatoria aguda es beneficiosa para el SNC, ya que contribuye a reparar el tejido dañado y a minimizar nuevas

lesiones. Sin embargo, la neuroinflamación crónica es frecuentemente una respuesta que se autoperpetúa y que persiste mucho después del estímulo tóxico, pudiendo desencadenar funciones anormales del cerebro (Eikelenboom et al., 2010; Lucas et al., 2006; Minter et al., 2016). La liberación sostenida de factores neuroinflamatorios podría perpetuar este proceso activando células gliales adicionales, principalmente microglía, que provoca la liberación de factores proinflamatorios y neurotóxicos, contribuyendo a la disfunción neuronal y consecuentemente a la EA (Harry & Kraft, 2008; Minter et al., 2016). Además, durante la neuroinflamación crónica, la BHE se ve frecuentemente comprometida (Banks et al., 2015; Man et al., 2007; Stolp & Dziegielewska, 2009), lo que facilita la infiltración de macrófagos periféricos hacia el cerebro para continuar el proceso inflamatorio. Por tanto, si la neuroinflamación tiene un efecto beneficioso o perjudicial en un determinado daño en el cerebro dependerá de la duración y la intensidad de la respuesta inflamatoria (Frank-Cannon et al., 2009; Jayaraj et al., 2019; Rivest, 2009).

Los dos principales tipos de células gliales que podemos encontrar en el SNC son la microglía y los astrocitos, cuya activación está muy relacionada con la neuroinflamación.

Microglía

La microglía es un conjunto de células del sistema inmune innato del cerebro, que constituye un 5-15 % de la población celular total de un cerebro adulto (S. U. Kim & de Vellis, 2005). Se encuentra principalmente en el hipocampo, ganglios basales y sustancia negra. Estas células son consideradas frecuentemente los macrófagos del SNC, siendo capaces de llevar a cabo procesos de fagocitosis y presentación de antígenos (Lawson et al., 1990). Desde su descubrimiento, hace cerca de un siglo (Sierra et al., 2019),

numerosos roles se han descrito para la microglía. Por ejemplo, la monitorización de la actividad sináptica en curso, incluyendo la remodelación sináptica, la eliminación de residuos y el apoyo trófico a las neuronas (Parkhurst et al., 2013; Sierra et al., 2010). Sin embargo, estas células multifunción también tienen un papel importante en la etiología y progresión de diferentes enfermedades neurodegenerativas.

Con el tiempo, nuestro entendimiento de cómo se produce la activación de la microglía ha evolucionado. Hasta hace poco, la activación de la microglía se entendía principalmente como microglía en reposo que se transformaba completamente en microglía activada (Boche et al., 2013; Kreutzberg, 1996) a través de dos mecanismos de activación posibles: M1, la activación clásica, considerada proinflamatoria y neurotóxica, así como estrechamente relacionada con el concepto de microglía «activada»; y M2, o activación alternativa, considerada antiinflamatoria y neuroprotectora (Michelucci et al., 2009). Sin embargo, pronto se hizo evidente que las respuestas de la microglía son mucho más complejas que una simple activación M1/M2 (Martinez & Gordon, 2014; Ransohoff, 2016).

La microglía tiene un complejo «sensoma» (Hickman et al., 2013), una serie de receptores de superficie que la convierten en células especialmente sensibles a las alteraciones de su entorno. Los estados de la microglía son, por lo tanto, dinámicos y el resultado del epigenoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma de la célula, que da lugar a cambios morfológicos, ultraestructurales y/o funcionales (Paolicelli et al., 2022). En el SNC maduro y sano, la distribución de la microglía es muy uniforme y generalmente regular (Hume et al., 1983; Paolicelli et al., 2022). Los cuerpos celulares son en gran parte sésiles, pero sus apéndices están continuamente en movimiento y explorando el parénquima cerebral (Hume et al., 1983; Nimmerjahn et al.,

2005). Las funciones de la microglía se adaptan a su localización e interacciones con otras células y estructuras cercanas; de esta manera, su morfología, ultraestructura y perfil molecular son igualmente dinámicos y plásticos, dando lugar a una gran variedad de diferentes estados celulares (Paolicelli et al., 2022). Aun así, dentro de los diferentes estados morfológicos que pueden tomar estas células, estos suelen ir de una morfología más ramificada hasta una morfología ameboidea (**Figura 5**).

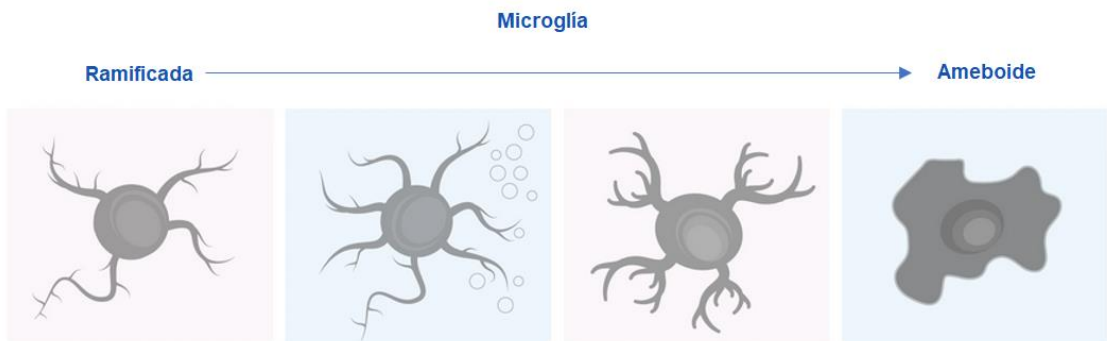


Figura 5: Estados de la microglía en el SNC. Fuente: How to identify activated microglia. Recuperado de: <https://www.ptglab.com/news/blog/how-to-identify-activated-microglia/> (Adaptado).

La microglía es capaz de secretar sustancias citotóxicas y de liberar mediadores proinflamatorios, como son la interleucina 1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α , del inglés *tumor necrosis factor α*) o la interleucina 6 (IL-6) (L. Li et al., 2007; Venneti et al., 2009; Vogels et al., 2019), las cuales desencadenan la degeneración neuronal por diferentes vías, convergiendo en la alteración de la proteína Tau. Posteriormente, se liberan al medio extracelular los agregados de proteína Tau alterada, manteniendo el estado activado de la microglía, además de su carácter neurotóxico (Avila, 2009; Gómez-Ramos et al., 2006; Maccioni et al., 2001, 2009; Maphis et al., 2015) (**Figura 6**).

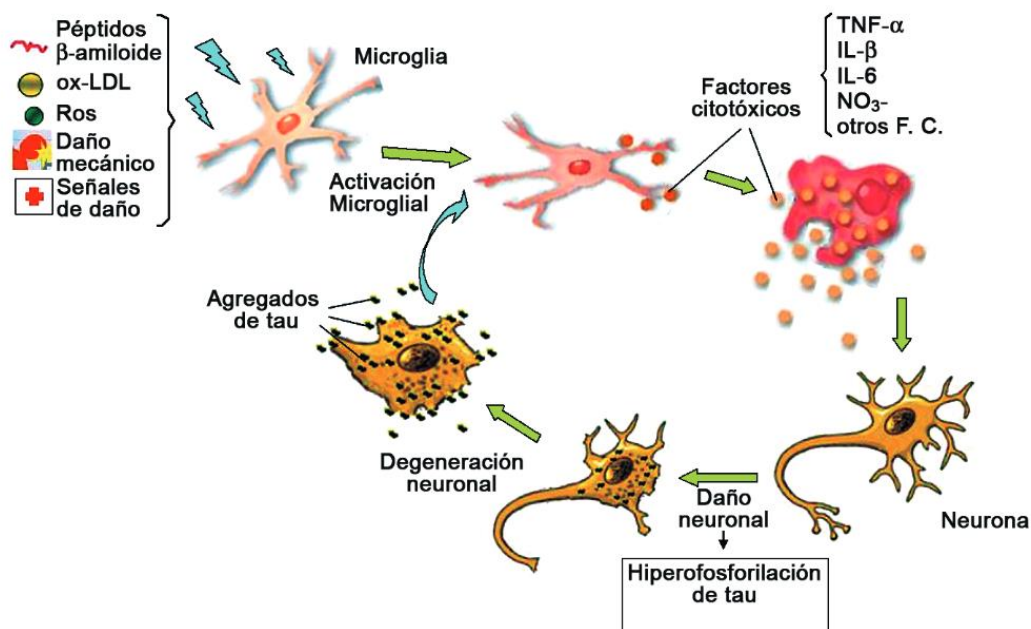


Figura 6: Activación microglial y su relación con otros eventos patológicos de la EA. Fuente: Morales et al., 2010 (Adaptado).

Por otro lado, algunos de los factores liberados por la microglía, como el factor neurotrófico derivado de la glía, son potencialmente beneficiosos para la supervivencia neuronal y favorecen el papel neuroprotector desempeñado por los astrocitos activados, el otro gran tipo de célula glial (Bali et al., 2019; B. I. N. Liu & Hong, 2003). Además, la función microglial también podría desempeñar un papel importante en la EA, ya que la microglía activada es capaz de reducir la acumulación de Aβ mediante el aumento de la fagocitosis, el aclaramiento y la degradación de este péptido (Xin et al., 2018; Q. Yan et al., 2003). De la misma forma, estas células son capaces de secretar enzimas proteolíticas, como son IDE, NEP y complejos plasminógeno-plasmina (S. Wang & Colonna, 2019; P. Yan et al., 2006). Sin embargo, a pesar de esta actividad protectora, la EA continúa avanzando. Posibles explicaciones a la incapacidad de la microglía para evitar la progresión de la EA serían: i) que se

sobrecargue con la gran cantidad de A β y no pueda seguir el ritmo de producción de la misma; ii) que se convierta en más proinflamatoria y pierda su capacidad de eliminar el A β , dando lugar a la disminución de la recaptación y la degradación (Hickman et al., 2008).

Como se ha descrito anteriormente, un proceso inflamatorio agudo impulsado por la microglía comienza como un mecanismo de «defensa y reparación» en respuesta a un estímulo que altera la homeostasis del cerebro, como el péptido A β . Esta respuesta aguda cuenta con mecanismos de control estrictos que aseguran que, una vez que la microglía ha realizado su función, vuelva a condiciones homeostáticas (L. Du et al., 2017). En las patologías neurodegenerativas, como es la EA, la acumulación de proteínas mal plegadas o dañadas, el estrés oxidativo o los procesos inflamatorios periféricos se han identificado como factores que contribuyen a la conversión de esta respuesta aguda en un proceso tóxico y crónico que se autoalimenta y que daña el tejido en vez de repararlo (J Herrera et al., 2015; Rodríguez-Gómez et al., 2020). Además, durante el envejecimiento, la microglía se vuelve disfuncional y se produce una reducción significativa de sus receptores de unión al péptido A β , así como de la producción de las enzimas encargadas de su degradación, mientras que mantienen su habilidad para producir citoquinas proinflamatorias y otras especies neurotóxicas (Merlo et al., 2020). Estas citoquinas pueden a su vez promover la producción del péptido, mediante la activación de la β - y la γ - secretasas y/o la reducción del aclaramiento, favoreciendo este círculo vicioso y participando en el desarrollo de la enfermedad (Venneti et al., 2009; D. G. Walker et al., 2009; W.-Y. Wang et al., 2015).

Por lo tanto, está claro que la microglía existe en estados multidimensionales, dinámicos y diversos dependiendo de su entorno. Dependiendo del estímulo, el contexto en el que se da o la intensidad y duración de este, la microglía presenta un amplio repertorio de estados que pueden participar en el desarrollo de la enfermedad, lo que deja patente que la clasificación dualista «M1 versus M2», «en reposo versus activado» o «bueno versus malo» de la microglía no es capaz de definir la complejidad de estas células gliales. Por lo tanto, un entendimiento de la microglía basado en diversas dimensiones donde se tengan en cuenta numerosas vías de señalización reguladas a múltiples niveles (transcripcional, epigenética, metabólica, etc) ayudaría a comprender mejor las distintas funciones y propiedades de la microglía (Paolicelli et al., 2022) (Figura 7).

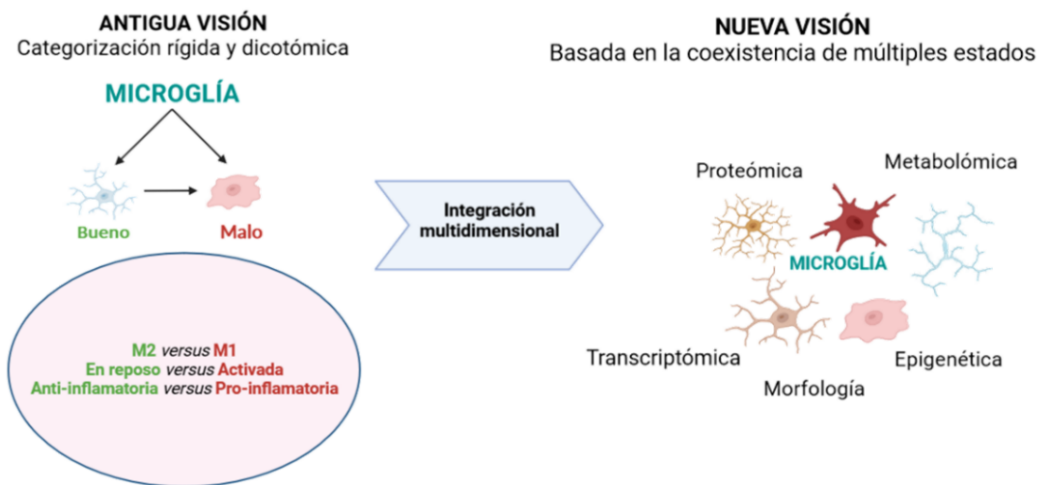


Figura 7: Nueva visión de la microglía. Fuente: Paolicelli et al., 2022 (Adaptado).

Astroцитos

Los astroцитos son células gliales especializadas que representan alrededor del 35 % del total de la población celular del SNC (Sherwood et al., 2006). En condiciones fisiológicas, los astroцитos llevan a cabo numerosas funciones relacionadas con el control de la función neuronal que son esenciales para el correcto funcionamiento del cerebro. Muchos de los procesos astrocíticos implican a las sinapsis, controlando firmemente la comunicación neuronal, siendo claves en la transmisión sináptica y el procesamiento de la información (Garwood et al., 2017; Halassa et al., 2007), lo que incluye: la preservación de la función sináptica (Danbolt, 2001; S. K. Kim et al., 2017; Tilleux & Hermans, 2007), el control de la despolarización neuronal (Giaume et al., 2007) y la respuesta a los neurotransmisores liberados por las neuronas. Pero los astroцитos no son solo importantes en el mantenimiento de las sinapsis de manera individual, sino que también tienen un papel importante en la coordinación de los circuitos neuronales mediante el control de cientos de sinapsis por cada astrocito (Dallérac et al., 2018; Halassa & Haydon, 2010; Ventura & Harris, 1999).

Diversas formas y grados de gravedad de lesiones y enfermedades cerebrales pueden desencadenar alteraciones en los astroцитos mediante un proceso conocido como astrogliosis reactiva, el cual no es un fenómeno de todo o nada, sino un proceso progresivo caracterizado por una variedad de cambios moleculares, celulares y funcionales (Pekny & Pekna, 2014). Estas alteraciones en los astroцитos reactivos están controladas por moléculas de señalización inter e intramolecular de forma específica para cada contexto y pueden potencialmente cambiar la actividad de los astroцитos mediante una ganancia o pérdida de su función, que puede tener un impacto beneficioso o perjudicial en las células colindantes (Sofroniew & Vinters, 2010). Durante la

astrogliosis leve o moderada, los astrocitos exhiben cambios morfológicos, incluyendo la hipertrofia y un aumento variable de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *glial fibrillar acidic protein*), mientras que la proliferación de estas células es limitada o inexistente. Esta astrogliosis leve o moderada puede revertirse si el estímulo nocivo es solucionado y si la arquitectura del tejido neuronal no ha sido profundamente afectada. Sin embargo, cuando la astrogliosis es severa, un marcado aumento de GFAP y otros genes es detectado, junto con una marcada hipertrofia de los cuerpos celulares, así como un aumento de la proliferación de los astrocitos (Pekny et al., 2016; Sofroniew, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010). Estas alteraciones pueden dar lugar a una reorganización de la arquitectura tisular que se mantiene en el tiempo, la cual se puede extender difusamente hacia otras áreas, y en algunos casos dar lugar a la formación de cicatrices gliales que pueden actuar como una barrera neuroprotectora frente a la inflamación (Boghdadi et al., 2020; Voskuhl et al., 2009). Las cicatrices gliales abarcan una interacción de astrocitos reactivos con otros tipos celulares —entre los que se encuentran las células microgliales— y la deposición de una matriz extracelular de colágeno (Hall et al., 2021). La sobreexpresión crónica a moléculas secretadas por la cicatriz glial inhibe la migración celular, lo que dificulta la regeneración neuronal y la recuperación funcional de la lesión (De Sousa, 2022; Hall et al., 2021; Rolls et al., 2009).

El cerebro de pacientes con EA presenta astrocitos reactivos que tienden a localizarse y a estar íntimamente relacionados con las PS, rodeándolas y pudiendo formar pequeñas cicatrices gliales (Kaur et al., 2019; Rossi & Volterra, 2009). Los astrocitos reactivos pueden contener cantidades sustanciales de diferentes formas de A β , principalmente A β ₄₂ y formas truncadas de A β , ya que estas células son eliminadores naturales de esta proteína. Sin embargo, la internalización y acumulación en los astrocitos

modifica profundamente su fenotipo metabólico con consecuencias perjudiciales para la viabilidad neuronal (Nagele et al., 2003; Söllvander et al., 2016, 2018). En diferentes estudios, se ha observado que los astrocitos en los que han ocurrido modificaciones producidas por una inflamación crónica (como es el caso de la EA) podrían sufrir una transformación dual perjudicial: por un lado, podrían perder su capacidad para eliminar y digerir el péptido A β (Söllvander et al., 2016, 2018; Wyss-Coray et al., 2003) y, por el otro lado, podrían adquirir la capacidad de generar este péptido (Frost & Li, 2017; Hoek et al., 2000). Además, los astrocitos reactivos, mediante la sobreproducción de citoquinas proinflamatorias, como TNF α , podrían contribuir a una reducción progresiva de la eficacia sináptica que se encuentra detrás del deterioro cognitivo en la EA (Rossi & Volterra, 2009; Singh & Abraham, 2017). De hecho, la importancia central de los astrocitos en la eliminación de A β , controlando la reactividad de la microglía y preservando la función homeostática de las sinapsis individuales y circuitos cerebrales, permite llegar a la conclusión de que juegan un papel muy importante en el desarrollo de la EA.

Por otro lado, el término «sinapsis tripartita» fue definido para contextualizar la evidencia obtenida por numerosos laboratorios durante la década de 1990, la cual revelaba la existencia de una comunicación bidireccional entre las neuronas y los astrocitos. Esta representaba un nuevo concepto en la fisiología sináptica, donde, además del flujo de información entre las neuronas pre y postsinápticas, los astrocitos intercambian información con los elementos neuronales sinápticos, respondiendo a la actividad sináptica y regulándola (Araque et al., 1999). De esta manera, el clásicamente aceptado paradigma de que la función cerebral es únicamente resultado de la actividad neuronal está siendo cuestionado por la evidencia acumulada, que sugiere que la función cerebral podría surgir de la actividad concertada de una red neurona-glía,

donde los astrocitos integrarían y procesarían la información sináptica y finalmente regularían la transmisión sináptica mediante la liberación de gliotransmisores, transmisores liberados por las células gliales implicados en la comunicación glía-neurona y glía-glía (Blutstein & Haydon, 2014).

Esta revolución iniciada al comienzo de la década de 1990 reveló que los astrocitos mostraban una forma de excitabilidad basada en variaciones de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} (Charles et al., 1991; Cornell-Bell et al., 1990). Hasta entonces, estas células habían sido consideradas no excitables porque, a diferencia de las neuronas, no muestran excitabilidad eléctrica (Orkand et al., 1966). Estudios posteriores en cortes cerebrales *in vitro* e *in vivo* establecieron firmemente la excitabilidad de los astrocitos, que se manifiesta como elevaciones del Ca^{2+} citosólico. De esta forma, mientras que las neuronas basan su excitabilidad celular en señales eléctricas, los astrocitos la basan en las variaciones de Ca^{2+} citosólico (Bazargani & Attwell, 2016). Estas variaciones de las concentraciones de Ca^{2+} pueden ocurrir espontáneamente, como oscilaciones intrínsecas en la ausencia de actividad neuronal (Aguado et al., 2002; O. Peters et al., 2003), pero también pueden ser producidas por la liberación de neurotransmisores durante la actividad sináptica (Harada et al., 2016). Esto es de crucial importancia, ya que indica la existencia de una comunicación de la neurona hacia el astrocito. El control sináptico de los niveles de Ca^{2+} está basado en que los astrocitos expresan una gran variedad de receptores de neurotransmisores, siendo muchos de estos de tipo metabotrópico que, durante su activación, favorecen la liberación de Ca^{2+} desde las reservas intracelulares y dan lugar a un aumento intracelular de dicho ion (Caudal et al., 2020). Al mismo tiempo, los astrocitos regulan la transmisión sináptica y la plasticidad mediante la liberación de moléculas neuroactivas como el glutamato, ATP, $\text{TNF}\alpha$ y la D-serina (Blutstein & Haydon, 2014). Estos neurotransmisores pueden ser liberados de manera

calcio-dependiente o independiente, y se ha observado que un mismo gliotransmisor puede ejercer múltiples efectos en función de los lugares de acción y los subtipos de receptores activados, lo que confiere una gran complejidad a la comunicación astrocito-neurona (**Figura 8**).

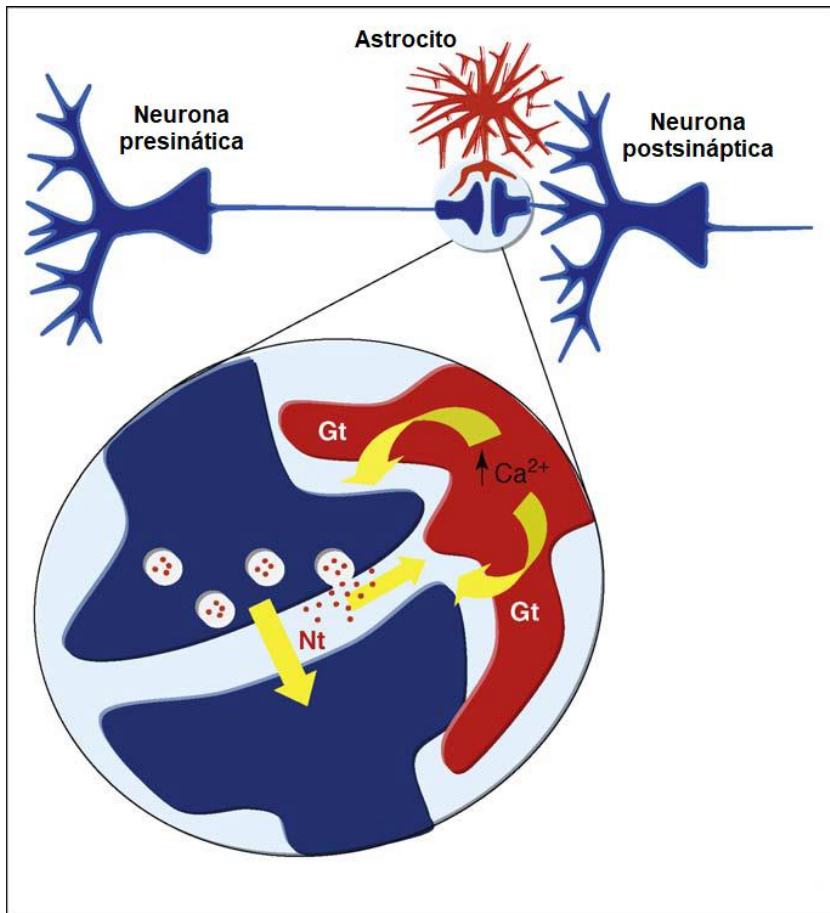


Figura 8: Esquema de la sinapsis tripartita. Nt: neurotransmisor; Gt: gliotransmisor. Fuente: Perea et al., 2009 (Adaptado).

Sin embargo, en los últimos años este concepto de sinapsis tripartita ha evolucionado. Además de los astrocitos, la matriz extracelular se ha incluido en la sinapsis, de manera que el término «sinapsis tetrapartita» se ha acuñado (Chelini et al., 2018; Dityatev & Rusakov, 2011). La matriz extracelular puede

responder a la actividad de la red incorporando moléculas secretadas o liberando productos de su escisión proteolítica como mensajeros de señalización (Dityatev et al., 2010; Pelucchi et al., 2022). Además, la matriz extracelular puede incorporar y almacenar restos moleculares tanto de la actividad neuronal como de la glial, así como participar en mecanismos de plasticidad sináptica y remodelación glial, apoyando este concepto de sinapsis tetrapartita (Dityatev & Rusakov, 2011; Pelucchi et al., 2022).

A pesar de este nuevo concepto, los distintos estudios llevados a cabo han dejado claro la complejidad del ambiente perisináptico. En particular, las interacciones de las sinapsis con su microentorno se ven influidas por la interposición de sinapsis individuales y la interacción con células no neuronales y el espacio extracelular, de manera que se necesita avanzar en el concepto «sinapsis tri(multi)partita», hacia un concepto que se ha denominado como «medio activo». Este término unifica diferentes nociones previas, como la sinapsis multipartita, la unidad neurovascular, la señalización sináptica y extrasináptica y una gran cantidad de diferentes conceptos usados para describir la organización funcional del cerebro (Semyanov & Verkhratsky, 2021).

En definitiva, los astrocitos son fundamentales para el mantenimiento sináptico (Verkhratsky & Nedergaard, 2014) y para el apoyo metabólico, por lo que la atrofia de estas células da lugar a una menor protección de las sinapsis, comprometiendo la homeostasis de iones y neurotransmisores y reduciendo el apoyo metabólico local. Esto genera consecuencias perjudiciales para la transmisión sináptica (Rodríguez & Verkhratsky, 2011), afectando a la plasticidad de las sinapsis y contribuyendo así a los déficits cognitivos iniciales observados en las primeras etapas de la EA (Verkhratsky et al., 2019).

1.4.5. Alteración de las espinas dendríticas

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias en las dendritas que presentan una notable variabilidad en forma y tamaño. Su densidad varía a lo largo de las ramificaciones dendríticas, así como entre tipos celulares y especies animales (Elson & DeFelipe, 2002; Jacobs et al., 1997, 2001; Rochefort & Konnerth, 2012). Cada espina tiene una cabeza y un cuello, y dentro de la cabeza de la espina hay una gran variedad de moléculas críticas para la señalización sináptica. Una característica de la cabeza es la densidad postsináptica, formada por receptores de neurotransmisores, moléculas de señalización y proteínas estructurales, unidas al citoesqueleto de la espina (Sheng & Kim, 2011). Este citoesqueleto se encuentra formado principalmente por filamentos de actina, que sirve tanto como entramado estructural como regulador principal del tráfico vesicular y de proteínas (Fifkov, 1985; Hotulainen & Hoogenraad, 2010). Entre los componentes principales de esta densidad postsináptica caben destacar: distintos receptores como el alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) y receptores de glutamato metabotrópicos, proteínas de adhesión y la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD95, del inglés *post synaptic density protein 95*), entre otras (Chidambaram et al., 2019; Okabe, 2007).

La clasificación más común de las espinas dendríticas ha dado lugar a cuatro tipos principales: *mushroom* («seta», del inglés), *thin* («estrecho», del inglés), *stubby* («achataado», del inglés) y filopodio. Las *mushroom* son las espinas prototipo, con un cuello delgado y una cabeza grande, siendo generalmente bastante estables en el tiempo (Pfeiffer et al., 2018); las *thin* tienen una cabeza y cuello delgados, siendo estructuras muy plásticas que pueden rápidamente

expandirse, dando lugar a nuevas espinas tipo *mushroom* (C. K. Walker & Herskowitz, 2021); las *stubby* son aquellas que no presentan una clara estructura que una la cabeza al eje dendrítico, siendo muy abundantes durante el desarrollo (Chidambaram et al., 2019); y las filopodio son consideradas las precursoras de las espinas y responsables de la formación de nuevas sinapsis con axones cercanos (C. K. Walker & Herskowitz, 2021) (Figura 9).

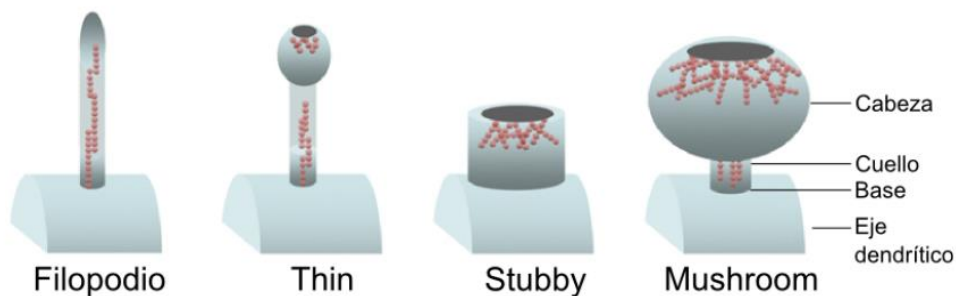


Figura 9: Morfología de las espinas dendríticas. Fuente: Sekino et al., 2007 (Adaptado).

Las sinapsis son plásticas, capaces de fortalecerse y debilitarse, y lo mismo ocurre con las espinas dendríticas. Incluso en animales adultos, estas estructuras pueden formarse o desaparecer, siendo las de mayor tamaño más persistentes que las más pequeñas (Grutzendler et al., 2002; Holtmaat & Svoboda, 2009; Majewska et al., 2006; Pfeiffer et al., 2018). Además, las espinas son estructuras muy dinámicas y presentan fluctuaciones intrínsecas independientes de la actividad (Bonilla-Quintana et al., 2020; Dvorkin & Ziv, 2016; Yasumatsu et al., 2008), así como un crecimiento o encogimiento dependiente de la actividad junto con el fortalecimiento o debilitamiento de las sinapsis (Kasai et al., 2003; M. Matsuzaki et al., 2004; Noguchi et al., 2011). Por ello, la caracterización en los diferentes tipos morfológicos previamente descritos debe ser considerada como una fotografía instantánea arbitraria de un sinfín de tipos morfológicos. Estos cambios dependen de reordenamientos del citoesqueleto de la espina, que permite cambios dinámicos en la morfología de

esta. Como lugar postsináptico de la mayoría de las sinapsis excitatorias del cerebro, las espinas dendríticas son fundamentales para el correcto funcionamiento neuronal. Sin embargo, la función de las espinas dendríticas va más allá del simple alojamiento de la maquinaria postsináptica. Estas estructuras también compartimentan la señalización eléctrica y bioquímica, lo que permite influir en la activación neuronal tras la llegada del impulso presináptico y limitar los cambios mediados por la plasticidad sináptica a sinapsis específicas (C. K. Walker & Herskowitz, 2021).

Las espinas dendríticas representan el lugar anatómico de la plasticidad, donde alteraciones a corto plazo en la fuerza sináptica se convierten en cambios duraderos que se integran en modificaciones estructurales estables (Sala & Segal, 2014). Los fenómenos de plasticidad sináptica dependientes de la actividad, como son la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *long term potentiation*) y la depresión a largo plazo (LTD, del inglés *long term depression*), proporcionan los mecanismos biológicos subyacentes a los procesos de aprendizaje y memoria porque determinan cambios estables en la fuerza sináptica y la estructura de las espinas (Kasai et al., 2003; Pelucchi et al., 2022).

La LTP es un aumento específico y duradero de la fuerza de la transmisión sináptica. La primera fase de la LTP está caracterizada por un cambio pasajero pero profundo de la composición proteica de la espina, con un rápido incremento de los niveles de actina y de la polimerización de la misma, que es requerida para el alargamiento de la espina dendrítica (Bosch et al., 2014). Además, la transmisión sináptica es potenciada a través de los receptores AMPA. Durante la fase final de la LTP, los niveles de calcio elevados a nivel postsináptico y la persistente activación de cinasas da lugar a la activación de

distintos factores de transcripción y a la síntesis de proteínas implicadas en la formación de espinas dendríticas (Bliss et al., 2003; Pelucchi et al., 2022).

Por su parte, la LTD consiste en un debilitamiento de la fuerza sináptica tras un estímulo y puede ocurrir mediante diversos mecanismos, que tienen efectos contrarios a los vistos en la LTP, incluyendo la internalización de los receptores AMPA y el encogimiento y pérdida de espinas. En general, la LTD es importante para la homeostasis, así como para borrar rastros de memoria antiguos y en situaciones que requieren flexibilidad conductual (Collingridge et al., 2010; Pelucchi et al., 2022).

En los fenómenos de plasticidad sináptica dependientes de actividad, la activación del receptor NMDA tiene un papel central, ya que puede inducir tanto la LTP como la LTD, dependiendo de la magnitud de la subida de calcio intracelular resultante en las espinas dendríticas y de la activación de cascadas intracelulares específicas (Kasai et al., 2010). De hecho, los niveles elevados y rápidos de entrada de calcio desencadenan la LTP, mientras que los niveles bajos de entrada de calcio se asocian con la LTD (Kullmann & Lamsa, 2007; Pelucchi et al., 2022).

La relevancia de la función sináptica emerge en condiciones patológicas. De hecho, es posible que las alteraciones persistentes en la fisiología de las sinapsis den lugar a defectos importantes que pueden manifestarse como trastornos cerebrales que han recibido el nombre de «sinaptopatías» (Lepeta et al., 2016). La EA puede considerarse una sinaptopatía, ya que se ha acumulado evidencia sustancial que indica que los déficits de memoria observados en pacientes no se correlacionan correctamente con la carga de PS. Por el contrario, la pérdida de marcadores sinápticos es un mejor predictor de los síntomas clínicos y la progresión de la enfermedad (Mufson et al., 2016; Selkoe, 2002). De hecho, en un estudio reciente se observó que la densidad de

espinas dendríticas en individuos con EA, pero con una cognición normal, era similar a los individuos control, los cuales no padecían de EA (Boros et al., 2019). Estudios en animales transgénicos de EA han reportado que, en la zona vecina a las PS, se producía una pérdida dramática de espinas dendríticas junto con una distrofia neurítica, cambios estructurales que podrían desencadenar la alteración de los circuitos neuronales y de las funciones cerebrales (Bittner et al., 2012; Spires et al., 2005; Spires-Jones et al., 2007).

Sin embargo, como se ha mencionado previamente, la idea de que los oligómeros solubles de A β , en vez de las PS, estarían detrás de la neurotoxicidad y la pérdida sináptica está cogiendo cada vez más fuerza (Ferreira et al., 2015). De hecho, el grado de demencia en los pacientes se correlaciona mejor con los niveles de oligómeros en cerebros *post mortem* (Bilousova et al., 2016; Koffie et al., 2009). En el mismo sentido, se ha visto que la eliminación del A β con la aplicación de anticuerpos resulta en un aumento de la formación de espinas dendríticas *in vivo* y en un aumento duradero de marcadores sinápticos (Pelucchi et al., 2022; Rozkalne et al., 2009; Spires-Jones et al., 2009), apoyando la idea de que la forma soluble de A β es tóxica para las sinapsis. El mecanismo preciso por el que A β podría afectar a la función sináptica no es completamente conocido, pero se cree que estos oligómeros podrían interactuar con distintas proteínas sinápticas, entre ellas PSD95. De hecho, uno de los primeros cambios observables es la reducción en los niveles de esta proteína, la cual es una reguladora clave del ensamblaje y anclaje de los componentes de la densidad postsináptica (Shao et al., 2011). La acción a nivel de la sinapsis de A β da lugar a una activación aberrante de los receptores NMDA (G.-M. Wu & Hou, 2010), a una desregulación de los niveles de Ca²⁺ (Lazzari et al., 2015) y a estrés celular, que a su vez conducen a disfunción sináptica y pérdida neuronal (Ferreira et al., 2015). De manera importante, por otro lado, la patología de Tau parece ser por sí misma una

contribuidora sustancial de la disfunción sináptica en la EA, habiéndose propuesto que se propaga a través de las estructuras cerebrales de una manera similar al A β (Lepeta et al., 2016).

Como se ha comentado al comienzo de este apartado, el componente esencial de las espinas dendríticas es la actina. La actina filamentosa (F-actina), formada por la polimerización de la actina globular, desempeña un papel fundamental en la integridad estructural y facilita la reestructuración dinámica en respuesta al aprendizaje (Chazeau et al., 2014; Hotulainen & Hoogenraad, 2010). De esta forma, se observó una disminución de los niveles de F-actina y una pérdida de espinas dendríticas en ratones APP/PS1 de un mes de edad (Kommaddi et al., 2018), sugiriendo que este fenómeno ocurre en fases tempranas de la EA. La cofilina es una de las proteínas de unión a actina más importantes y regula el citoesqueleto de actina en las neuronas, principalmente mediando la escisión de la F-actina (Rust, 2015). La principal función de la cofilina está relacionada con su capacidad de unirse a la actina, la cual está controlada por la fosforilación, de manera que la cofilina fosforilada no puede unirse a la actina y se considera inactiva (Rust, 2015). Interesantemente, la aplicación de oligómeros de A β redujo su fosforilación, aumentando su actividad (Deng et al., 2016; T. Kim et al., 2013). Además, la fosforilación de esta proteína se vio reducida en ratones con EA (Deng et al., 2016; Kommaddi et al., 2018) y en la corteza frontal de enfermos de EA (T. Kim et al., 2013). Sin embargo, revisiones recientes sobre el papel de la cofilina en la EA especificaron que distintos laboratorios habían llegado a conclusiones opuestas sobre la fosforilación de esta proteína y su influencia en la patofisiología de la EA, indicando que su rol en esta enfermedad aún no es comprendido en su totalidad (Ben Zablah et al., 2020; Kang & Woo, 2019). Por un lado, se propone que el A β promueve la activación de fosfatasa, lo que lleva a la desfosforilación y activación de la cofilina. El incremento en su actividad daría

lugar a una escisión temprana de la F-actina, inhibiendo el desarrollo de las espinas dendríticas (T. Kim et al., 2013; Lao et al., 2021). Por otro lado, se ha propuesto un modelo en el que la acumulación de A β causa la activación de cinasas, que fosforilan e inactivan a la cofilina. La inhibición de la escisión de la F-actina podría dar lugar a un crecimiento aberrante de las espinas dendríticas (Rush et al., 2018; Rust, 2015; Rust et al., 2010). A pesar de estas observaciones contradictorias, estos estudios proporcionan pruebas sólidas que demuestran que la activación de la cofilina también es prometedora como diana para el tratamiento de la EA.

En relación con las espinas dendríticas, el concepto de resiliencia cognitiva ha ganado popularidad en los últimos años. Este concepto se define como la habilidad de permanecer cognitivamente normal ante alteraciones del cerebro, entre las que se pueden encontrar PS y ONF típicos de la EA. Aproximadamente, un tercio de las personas de más de 80 años son cognitivamente normales a pesar de presentar PS y ONF a niveles comparables con los observados en la fase moderada de EA (Bennett et al., 2014). Por lo tanto, se hipotetiza que estas personas podrían ser resilientes a la EA, ya que muestran unas mayores habilidades cognitivas de las que se esperarían basándose en el nivel patológico del cerebro. Como se ha dicho anteriormente, la EA se ha correlacionado con una disminución de la densidad de espinas dendríticas; sin embargo, en los casos resilientes, el número de espinas dendríticas a penas se ha modificado (Boros et al., 2017; Neuner et al., 2022). Además, en estos casos se han observado un mayor número de espinas dendríticas tipo *thin* en comparación con el grupo control o con los casos de EA, lo que podría permitirles mantener las conexiones sinápticas o bien formar nuevas en presencia de la patología (Boros et al., 2019; Dumitriu et al., 2010; Young et al., 2014). Entre los factores que podrían contribuir a la resiliencia cognitiva en la EA, destacan el ejercicio físico, la actividad mental y la

transcripción de genes de densidad postsináptica. Estos factores probablemente favorecen el mantenimiento de la densidad espinal y promueven la plasticidad estructural de la morfología de la espina dendrítica (C. K. Walker & Herskowitz, 2021) (Figura 10).

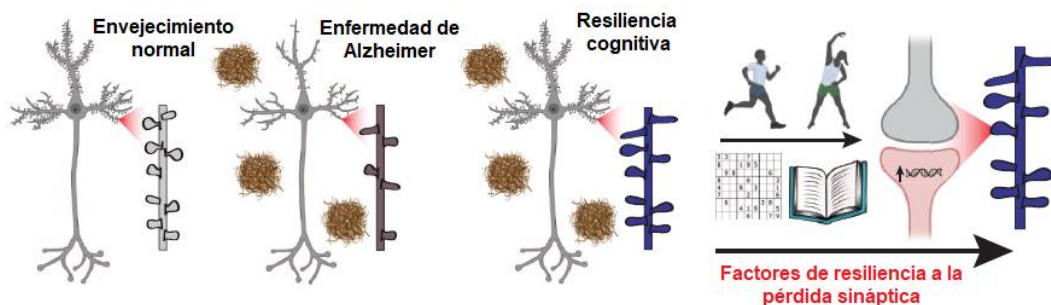


Figura 10: Espinas dendríticas y factores que influyen en la resistencia cognitiva a la patología de la enfermedad de Alzheimer. Fuente: C. K. Walker & Herskowitz, 2021 (Adaptado).

1.5. Factores de riesgo de la EA

En la actualidad, la reducción del riesgo de padecer EA depende principalmente de modificaciones del estilo de vida y de la mejora de los tratamientos o de la prevención de enfermedades que confieren un riesgo adicional. Sin embargo, una parte del riesgo de padecer EA es debido a la genética, bien por mutaciones en los genes APP, PSEN1 y PSEN2 —que darían lugar a la EA familiar, como se ha descrito anteriormente—, bien por mutaciones principalmente en el gen de la apolipoproteína E (*APOE*) (Giri et al., 2016).

Factores genéticos

La APOE es una proteína implicada en el metabolismo lipídico y está codificada por el gen *APOE*, que se encuentra en el cromosoma 19 (Forero et al., 2018). Existen tres alelos descritos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, dando lugar a las isoformas

ApoE2, ApoE3, ApoE4), que se encuentran presentes en la población a diferentes frecuencias (Silva et al., 2019). *APOE4* representa el principal factor de riesgo genético de padecer la EA. La presencia de $\epsilon 4$ en heterocigosis multiplica por tres el riesgo de padecer EA, mientras que, en homocigosis, el riesgo se multiplica por doce (Ryu et al., 2019; Sims-Robinson et al., 2010). Por el contrario, la presencia del alelo $\epsilon 2$ reduce el riesgo de desarrollar EA (Karch & Goate, 2015; Mahley, 2016). Se ha observado que mientras la isoforma ApoE4 se une al péptido A β promoviendo su polimerización en fibrillas y su consecuente deposición, las formas ApoE2 y ApoE3 son más eficientes a la hora de promover la eliminación de este péptido, reduciendo su deposición en el tejido cerebral (J. Kim et al., 2009). La proteína ApoE tiene efectos neuroprotectores y es capaz de participar en el desarrollo neuronal, siendo las isoformas ApoE2 y ApoE3 más eficientes en esta actividad (Muñoz et al., 2019; Rebeck et al., 2002). Además, se ha observado que los fragmentos de ApoE generados por proteasas tienen efectos tóxicos, que podrían derivar en daño neuronal y favorecer la deposición de A β (Hauser et al., 2011; J. Kim et al., 2009).

Factores ambientales

A parte de los factores de riesgo genéticos, existen factores ambientales que han sido relacionados con el desarrollo de la EA. Además de los que se desarrollarán a continuación, encontramos muchos otros, como son: el tabaquismo, la falta de ejercicio físico, el estrés, la depresión, un nivel educativo bajo o el consumo de alcohol (Campdelacreu, 2014). Ya que ninguna intervención farmacológica ha sido capaz de poner fin a esta enfermedad, la adopción de medidas que supongan un cambio en el estilo de vida podría suponer una estrategia para prevenir o retrasar la aparición de la EA (**Figura 11**).

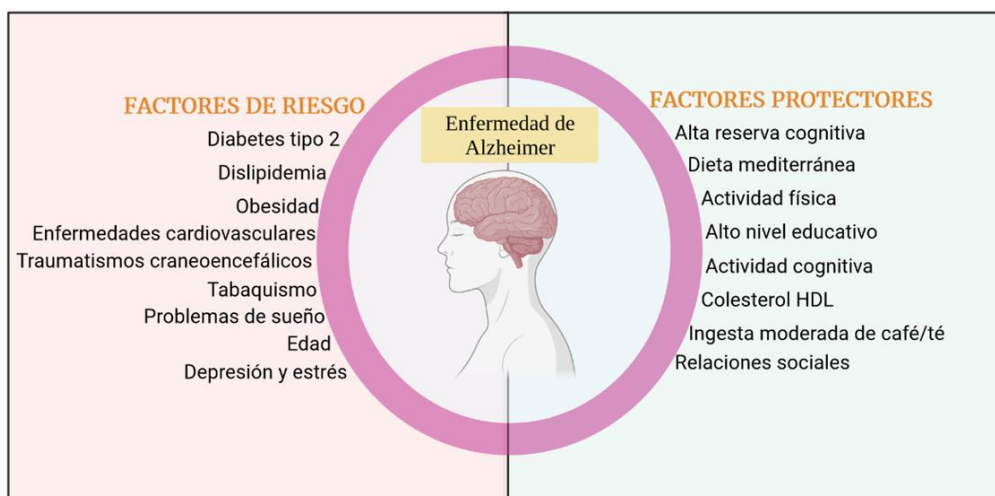


Figura 11: Factores de riesgo y protectores de la EA.

Edad

Ha sido demostrado que entre los diferentes factores demográficos como son la edad, el sexo, la raza y la clase social, la edad es uno de los factores de riesgo más importante de padecer deterioro cognitivo (Doruk et al., 2010; Eshkoor et al., 2015) y EA (Herrup, 2010; Xia et al., 2018). Con la edad, la prevalencia de EA aumenta hasta un 19 % en individuos de 75 a 84 años de edad (Knopman, 2001) y al 30-35 %, posiblemente hasta un 50 %, entre los mayores de 85 años (Ferry et al., 2005).

Sexo

Mujeres y hombres presentan diferencias en el desarrollo y la progresión de la EA, teniendo las mujeres un riesgo dos veces mayor de desarrollar EA a lo largo de su vida que los hombres (Laws et al., 2016). Aunque la mayoría de las pruebas sugieren que la incidencia de la EA es similar en hombres y mujeres (Mielke et al., 2014; Pike, 2017), las mujeres parecen tener una mayor incidencia de EA en la vejez (C. Qiu, Kivipelto, & Von Strauss, 2022). Además,

las mujeres muestran una progresión más robusta del MCI (Lin et al., 2015) y una mayor gravedad de la demencia clínica (Irvine et al., 2012; Mielke et al., 2014; Pike, 2017).

Esta diferencia de incidencia entre sexos plantea interrogantes sobre la posible contribución de la deficiencia hormonal relacionada con la menopausia y aborda cuestiones específicas de las mujeres. Así, se ha demostrado que la presencia del ApoE4 afecta a la probabilidad de desarrollar EA en mayor medida en las mujeres que en los hombres (Pike, 2017). Además, en las mujeres, este polimorfismo común aumenta en mayor medida el riesgo de conversión de cognitivamente normal a MCI y de MCI a EA (Altmann et al., 2014). Por otro lado, los estrógenos tienen una amplia gama de acciones beneficiosas en el cerebro y otros tejidos y su pérdida puede razonablemente esperarse que confiera un mayor riesgo de padecer EA. En consonancia con esta posibilidad, algunos estudios sugieren que la reducción de estrógenos en la edad adulta está asociada a un mayor riesgo de EA en las mujeres (Pines, 2016; Rosario et al., 2011), hecho que es apoyado por estudios donde se observó que la menopausia inducida quirúrgicamente mediante ooforectomía y/o histerectomía aumentaba significativamente el riesgo de desarrollar esta enfermedad (Bove et al., 2014; Pillay & Manyonda, 2022; Rocca et al., 2011).

Reforzando la importancia del papel de las hormonas en el desarrollo de la EA, en el caso de los hombres se ha observado que la disminución normal de testosterona relacionada con la edad está asociada con un mayor riesgo de EA (Bianchi, 2022; Marriott et al., 2022). Estas observaciones sugieren que, paralelamente a la asociación entre un nivel bajo de estrógenos en las mujeres y un mayor riesgo de EA, unos niveles reducidos de testosterona pueden favorecer el desarrollo de EA en los hombres. Sin embargo, esta relación parece ser específica del sexo, ya que los niveles cerebrales de testosterona no

fueron significativamente diferentes en las mujeres con EA (Dong et al., 2021; Rosario et al., 2011). En conclusión, tanto los estrógenos como los andrógenos ejercen numerosas acciones protectoras en el cerebro adulto que aumentan el funcionamiento neuronal y la resiliencia, además de atenuar específicamente múltiples aspectos de la neuropatología relacionada con la EA. El envejecimiento disminuye los efectos de acción de las hormonas sexuales de forma específica para cada sexo, lo que contribuye a la relación entre el envejecimiento y la EA. Estos hallazgos ofrecen valiosas oportunidades tanto para comprender la enfermedad como para desarrollar intervenciones eficaces y, tal vez, específicas para cada sexo.

Reserva cognitiva

Diferentes estudios han relacionado la EA con una disminución de la capacidad de reserva del cerebro, incluyendo una disminución del tamaño cerebral, un bajo nivel educativo y profesional, una baja capacidad mental en los primeros años de vida y una menor actividad mental y física en la edad adulta (Mayeux, 2003; Mortimer et al., 2003; Stern & Barulli, 2019). La reserva cognitiva del cerebro está determinada por el número de neuronas y su arborización sináptica y dendrítica, junto con las estrategias cognitivas relacionadas con el estilo de vida. Una baja reserva cognitiva se ha relacionado con la manifestación temprana de algunos de los cambios patológicos de la enfermedad (Arenaza-Urquijo et al., 2015; Mayeux, 2003). Además, uno de los factores asociados a esta pérdida de la reserva del cerebro son los traumatismos craneoencefálicos, aunque no se sabe con claridad si estos traumatismos contribuyen a la EA porque dan lugar a una disminución de la reserva cognitiva o porque desencadenan la cascada patogénica que acaba dando lugar a la formación de PS y ONF (Blennow et al., 2006).

Enfermedades cerebrovasculares

Las enfermedades cerebrovasculares y la EA comparten numerosos factores de riesgo, que a veces se solapan. Cambios cerebrovasculares como infartos hemorrágicos, pequeños y grandes infartos isquémicos corticales o vasculopatías se han relacionado con un aumento del riesgo de demencia (Silva et al., 2019). Análisis *post mortem* de cerebros de pacientes con EA indican la presencia de accidentes cerebrovasculares, con brotes hemorrágicos e infartos en más de un 50 % de los cerebros estudiados (Love & Miners, 2016; Mayeux & Stern, 2012). Además, de acuerdo con Liu y colaboradores, se ha observado que entre un 6 y un 47 % de individuos con demencia presentan al mismo tiempo una enfermedad cerebrovascular, mostrando así la posible relación que existe entre ambos acontecimientos (W. Liu et al., 2015).

Dieta y obesidad

La relación entre los efectos de la dieta y el riesgo de padecer EA están basados en ciertos patrones que han sido relacionados con una mayor o menor posibilidad de desarrollar dicha enfermedad (de Wilde et al., 2017). Se ha demostrado que la dieta mediterránea, que es rica en ácidos grasos insaturados y antioxidantes, confiere un cierto grado de protección (de Wilde et al., 2017; Scarmeas et al., 2009). Algunos componentes de la dieta son esenciales para la protección cognitiva, como los ácidos grasos alimentarios, —por ejemplo, el omega-3, presente principalmente en el pescado—; los antioxidantes —como la vitamina E y la C—; las frutas y los vegetales; las vitaminas B6 y B12; y el folato, además de una restricción calórica (P. J. Smith & Blumenthal, 2010). A diferencia de estas dietas, las dietas ricas en ácidos grasos saturados y trans y con bajos niveles de sustancias antioxidantes han sido relacionadas con un mayor riesgo de padecer la EA (Sinyor et al., 2020; R. Zhu et al., 2021). En

relación con la ingesta calórica, se ha observado que un mayor índice de masa corporal a mediana edad aumenta proporcionalmente el riesgo de padecer EA (Tolppanen et al., 2014), lo que sugiere que los cambios metabólicos asociados a la obesidad dañan el SNC, dando lugar a la muerte neuronal por apoptosis o necrosis mediante la alteración de la plasticidad de las neuronas (Mazon et al., 2017).

Por todo ello, en los últimos años, cada vez más los estudios sobre la EA han estado centrados en la relación existente entre las enfermedades metabólicas y dicha enfermedad, ya que en el mundo occidental se está produciendo un aumento de la ingesta calórica y del consumo de dietas ricas en ácidos grasos saturados, lo que se está traduciendo en un aumento de la incidencia de EA. Además, el consumo de estas dietas se ha relacionado con un aumento de la resistencia a la insulina y del desarrollo de DMT2 (Graham et al., 2016; Kopp, 2019), que a su vez genera un aumento de la inflamación, del estrés oxidativo y de otros mecanismos implicados en la disfunción cognitiva.

2. La EA y la diabetes mellitus

2.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de una hiperglucemia crónica acompañada por una mayor o menor alteración del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Conget, 2002). Una consecuencia de la hiperglucemia crónica es la afectación grave de muchos órganos y sistemas del cuerpo, sobre todo los nervios y los vasos sanguíneos. El origen y la etiología de esta enfermedad puede ser muy variada, pero siempre supone bien un fallo en la secreción de la insulina, bien en la respuesta a la acción

de la hormona, bien de ambas en algún momento de la enfermedad (Conget, 2002). La insulina es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos, producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. Esta molécula permite la entrada de glucosa en las células, interviniendo en el metabolismo de los nutrientes, para la síntesis de los componentes celulares (Tokarz et al., 2018).

Existen dos formas de esta patología:

— La DM tipo 1 (DMT1): también conocida como diabetes autoinmune. Es una enfermedad crónica caracterizada por una deficiencia de insulina debido a una destrucción de las células beta de los islotes de Langerhans, que acaba dando lugar a un estado de hiperglucemia crónico (Lucier & Weinstock, 2018). Aunque normalmente suele aparecer durante la infancia o la adolescencia, los síntomas en ocasiones se pueden desarrollar mucho después (Katsarou et al., 2017). El tratamiento usado es la administración de insulina.

— La DMT2: también conocida como insulino dependiente. Este tipo se caracteriza porque representa más del 90 % de todos los casos de DM (DeFronzo et al., 2015). Hoy en día sigue sin conocerse con exactitud si son los defectos en la producción de insulina o los problemas en la acción periférica de esta hormona los causantes del desarrollo de la DMT2. Teniendo en cuenta lo íntimamente relacionadas que se encuentran la secreción de la insulina y la sensibilidad a la acción de la misma en la homeostasis de la glucosa, es difícil diferenciar la contribución por separado de cada una de ellas, participando y coexistiendo ambos fenómenos en el desarrollo de la enfermedad (Conget, 2002). Además, la prevalencia de la DMT2 está alcanzando niveles preocupantes, ya que en un estudio reciente se demostró que en apenas treinta años la prevalencia de esta enfermedad solo en personas jóvenes de entre 15 y 39 años ya se había

incrementado en un 56,4 %, pasando de una incidencia de 117 casos por cada 100 000 habitantes en 1990 a una de 183 en 2019 (Xie et al., 2022).

2.2. La glucosa en el cerebro

El cerebro de los mamíferos depende de la glucosa como su principal fuente de energía. En el cerebro adulto, las neuronas presentan la mayor demanda de energía, requiriendo constantemente glucosa de la sangre (Howarth et al., 2012). En los humanos, el cerebro representa aproximadamente el 2 % del peso corporal; sin embargo, consume un 20 % de la energía derivada de la glucosa, convirtiéndolo en el principal consumidor de la misma (Mergenthaler et al., 2013). El metabolismo de la glucosa aporta la energía necesaria para el funcionamiento fisiológico del cerebro a través de la generación de ATP, representando la base para el mantenimiento celular neuronal y no neuronal, así como para la generación de neurotransmisores. Por lo tanto, una regulación estricta del metabolismo de la glucosa es crucial para la fisiología del cerebro y un metabolismo alterado en el cerebro da lugar a diferentes enfermedades que afectan tanto al cerebro en sí como al resto del organismo (Mergenthaler et al., 2013).

La dependencia de este órgano de la glucosa como combustible obligatorio deriva principalmente de la BHE y su permeabilidad selectiva para esta molécula en el cerebro adulto (Koepsell, 2020). A diferencia de otros órganos, como el hígado o el músculo, la entrada de sustancias neuroactivas hacia el cerebro está restringida por la BHE, por lo que tienen que ser sintetizadas en el propio cerebro a partir de la glucosa. El gran gradiente de concentración sangre-cerebro facilita el transporte de glucosa a través de las membranas endoteliales mediante el transportador de glucosa 1 (GLUT1, del inglés *glucose transporter protein type 1*) hacia el espacio extracelular. Además, GLUT1 interviene en la captación de glucosa desde el

líquido extracelular hacia los astrocitos, oligodendrocitos y microglía, mientras que GLUT3 —el cual tiene una tasa de transporte mayor que GLUT1— facilita la captación neuronal de glucosa (Koepsell, 2020; Simpson et al., 2007).

Además, se ha sugerido que el lactato producido por los astrocitos es otro substrato energético clave usado preferentemente por las neuronas (Juaristi et al., 2019; Magistretti & Pellerin, 1999; Newman et al., 2011). La liberación de glutamato durante la activación neuronal estimula la captación de glucosa y la producción de lactato en los astrocitos del parénquima cerebral. La mayoría del lactato astrocítico es obtenido a partir del metabolismo anaeróbico de la glucosa y una pequeña parte a partir de la glucogenolisis (Bouzier-Sore & Pellerin, 2013; Tekkök et al., 2005). Aun así, para que los astrocitos puedan producir este lactato, se sigue necesitando que la glucosa sea transportada a través de la BHE y la membrana astrocítica mediante transportadores.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el transporte de glucosa a través de la BHE y/o la membrana plasmática neuronal puede convertirse en un paso limitante en condiciones de disminución del combustible cerebral o en situaciones patológicas como la EA, la epilepsia, la demencia, la isquemia y las lesiones cerebrales traumáticas (Koepsell, 2020; Xiuli et al., 2005). Se ha observado que en la EA el uso de la glucosa difiere según la región (ANÇEVIC IV et al., 2000; Koepsell, 2020; Kuhl et al., 1982; Y. Liu et al., 2008). Según Hoyer (Hoyer, 2004), esta variación es causa de la neurodegeneración y no solo una mera coincidencia. Además, mediante estudios del transporte de glucosa en el cerebro humano con EA (De Santi et al., 2001; Heiss et al., 1991; Jagust et al., 1991; Koepsell, 2020; Piert et al., 1996) usando la tomografía de emisión de positrones (PET, del inglés *positron emission tomography*), se ha observado una reducción en el transporte de glucosa en las regiones cerebrales metabólicamente más activas, como el córtex, el hipocampo y los microvasos cerebrales (Marcus et al., 2014).

Asimismo, como se ha explicado en el apartado anterior, una alteración de la neurotransmisión colinérgica es considerada un sello distintivo de la EA. Se sabe que la síntesis de la ACh es sensible al metabolismo de la glucosa cerebral (Jankowska-Kulawy et al., 2022; Y. Li et al., 2014; Sorbi et al., 1983; Spillane et al., 1979). Por lo tanto, la reducción de los niveles de glucosa en el cerebro podría tener un efecto negativo en la función cognitiva (Cunnane et al., 2011; Jankowska-Kulawy et al., 2022).

En conclusión, existe una gran evidencia clínica y experimental que muestra una disminución del metabolismo y del transporte de la glucosa en los cerebros con EA, lo que deja patente su importancia en el desarrollo de esta enfermedad (Croteau et al., 2018; Hooijmans et al., 2007; Koepsell, 2020; Y. Liu et al., 2008; Neth & Craft, 2017; Weise et al., 2018).

2.3. La insulina en el cerebro

2.3.1. La insulina

La insulina fue aislada por primera vez por Banting y Best (Banting & Best, 2007), siendo conocida como la mayor e inmediata reguladora de los niveles de glucosa en sangre, estimulando la captación de glucosa por el hígado, el músculo y el tejido adiposo (Tokarz et al., 2018). Sin embargo, el transporte de la glucosa hacia el cerebro y el uso de la glucosa por la mayoría de las células presentes en este órgano es independiente de la insulina (Banks et al., 2012). Consecuentemente, el interés científico sobre el papel de la insulina a nivel central se vio disminuido. A pesar de ello, estudios posteriores encontraron una relación más directa entre la insulina y el SNC (Chowers et al., 1961, 1966), llevando a los científicos a asumir que la insulina se encontraba presente en altas concentraciones en el SNC (Havrankova et al., 1978), lo que sugería que esta hormona podía tener funciones que iban más allá de la captación de glucosa.

Otro de los puntos de debate era si la insulina era capaz de atravesar la BHE o si podía ser sintetizada en el propio cerebro. La cuestión de si la insulina es fabricada en el cerebro de los mamíferos se apoya en la expresión de esta hormona en el cerebro de las llamadas especies inferiores (Caruso & Sheridan, 2011; McRORY & SHERWOOD, 1997). Sin embargo, en mamíferos, la única fuente extrapancreática de insulina que ha sido claramente descrita está formada por un pequeño grupo de células localizadas en la mucosa olfatoria (Lacroix et al., 2008). Con ninguna fuente de producción de la insulina en el SNC, su presencia en el líquido cefalorraquídeo es una evidencia de que la insulina cruza la BHE (Arnold et al., 2018; Bromander et al., 2010; Ghasemi et al., 2013). Posteriormente, estudios que usaban insulina exógena o marcada radioactivamente confirmaron que esta hormona cruzaba la BHE mediante un mecanismo saturable (Banks et al., 1996; Baura et al., 1993; Poduslo et al., 1994; Schwartz et al., 1991). En contraste al flujo saturable de la sangre hacia el cerebro, no hay evidencia de que exista el mismo fenómeno en el flujo de la insulina desde el cerebro a la sangre (Cashion et al., 1996). Sin embargo, la evidencia sugiere que la insulina del SNC pasa al flujo sanguíneo mediante la reabsorción del líquido cefalorraquídeo (Banks et al., 2012).

En condiciones fisiológicas, los niveles de insulina encontrados en el cerebro se correlacionan con los niveles de esta hormona a nivel periférico (Woods & Porte Jr, 1977). Sin embargo, un mecanismo de transporte de la insulina a través de la BHE saturable implica que, en algún momento, un aumento de los niveles séricos de insulina no se traducirá en un aumento de sus niveles cerebrales (Banks et al., 2012).

2.3.2. Funciones de la insulina en el SNC

Glucoregulación

El metabolismo de la glucosa en todo el organismo es coordinado por el cerebro (Kleinridders et al., 2014; Schwartz et al., 1992, 2000; Stockhorst et al., 2004) y depende de la acción eficiente de la insulina en este órgano. La insulina modula el metabolismo periférico de la glucosa a través de los receptores de insulina (RI) localizados en el hipotálamo (Kleinridders et al., 2014; Pocai et al., 2005). La administración central de insulina aumenta la sensibilidad a la misma en tejidos periféricos asociado a una caída de la producción hepática de la glucosa (Alquier & Kahn, 2004; Heni et al., 2014; Pocai et al., 2005; Schwartz et al., 1992). Un mecanismo intacto de señalización hipotalámica de la insulina es necesario para que la insulina sistémica inhiba la producción endógena de glucosa. Al alterarse la señalización hipotalámica de esta hormona, la consecuente disminución de la sensibilidad hepática a la insulina circulante estimulará la producción de glucosa por parte del hígado (Heni et al., 2014; Obici et al., 2002; Stockhorst et al., 1999).

Efectos sobre la ingesta y el balance energético

Uno de los roles importantes de la insulina en el cerebro está relacionado con el control de la ingesta de alimentos, el peso corporal y la regulación del equilibrio energético (Figlewicz, 2003; Loh et al., 2017; Plum et al., 2005). En este contexto, el papel de la insulina central y periférica en la homeostasis energética están parcialmente disociados. Mientras que, tras una administración periférica, intravenosa o subcutánea, la insulina actúa como una hormona anabólica —disminuyendo la gluconeogénesis, aumentando la síntesis de glucagón y promoviendo la lipogénesis en las células adiposas, lo que provoca un aumento del peso corporal (Mitchell & Begg, 2021; Russell-Jones & Khan, 2007)—, la

administración intranasal e intracerebroventricular, por el otro lado, induce efectos catabólicos mediante la reducción de la ingesta de alimentos (Benedict et al., 2011; Figlewicz, 2003; Ruud et al., 2017; Schulingkamp et al., 2000; Schwartz et al., 2000), aumentando el gasto de energía, y como consecuencia, reduciendo el contenido de grasa total en humanos y animales (Begg & Woods, 2011; Benedict et al., 2011; Benoit et al., 2002; Ruud et al., 2017).

Efectos sobre la plasticidad sináptica y la memoria

La estreptozotocina es un agente diabetógeno usado ampliamente para generar un modelo de DMT2 caracterizado por un estado de insulopenia debido a la destrucción de las células β del páncreas (Furman, 2015; Schnedl et al., 1994). Previos estudios han usado este modelo para demostrar que ratones con una deficiencia en insulina desarrollan alteraciones cognitivas y problemas de aprendizaje espacial y de memoria (Biessels et al., 1998; Knezovic et al., 2015; Zhou et al., 2013). Interesantemente, una dosis baja de insulina vía intranasal mejoró las alteraciones de comportamiento, moleculares y morfológicas en el cerebro diabético, sin modificar los niveles sistémicos de glucosa (Francis et al., 2008), dejando entrever de esta manera el papel de la insulina en el mantenimiento de la función cognitiva.

El RI juega diferentes papeles en el cerebro como regulador de la plasticidad sináptica (De Felice & Benedict, 2015; Stockhorst et al., 2004), del crecimiento de las dendritas (Chiu et al., 2008; Derakhshan & Toth, 2013), así como su implicación en la supervivencia neuronal (Bondareva & Chistyakova, 2007). Se ha visto que vías que son esenciales para la plasticidad sináptica se superponen con las de la vía de la insulina (Chiu et al., 2008; C.-C. Huang et al., 2010). Diferentes estudios han demostrado que la insulina contribuye al cambio en la plasticidad sináptica del hipocampo mediante el apoyo al LTP y

LTD en diferentes sinapsis (Frame & Zheleva, 2006; C.-C. Huang et al., 2010; Schulingkamp et al., 2000; Zou et al., 2020). Además, se ha descrito que el RI es capaz de regular el número de sinapsis y contribuye a la plasticidad estructural experiencia-dependiente, que es esencial para el desarrollo de nuevas sinapsis (Chiu & Cline, 2010; De Felice & Benedict, 2015).

2.3.3. El receptor de la insulina

Las vías de señalización de la insulina son activadas tras la unión de la insulina al RI, el cual pertenece a una familia de receptores tirosín-cinasa que incluye también al receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-R, del inglés *insulin-like growth factor I receptor*) (Hubbard, 1999; Z. Li et al., 2005). Las principales propiedades de los RIs cerebrales son las mismas que las de los receptores periféricos. En el SNC, los RIs se encuentran distribuidos amplia pero heterogéneamente, con una mayor densidad en el hipotálamo, los bulbos olfatorios y el hipocampo (Pomytkin et al., 2018; Schulingkamp et al., 2000; Unger et al., 1989).

El RI es una proteína tetramérica, formada por dos subunidades α , situadas en la región extracelular, y dos β , insertadas en la membrana celular (Bondareva & Chistyakova, 2007; De Meyts, 2016). La unión de la insulina a la subunidad α resulta en la activación y autofosforilación de los residuos de tirosina de las subunidades β (Bondareva & Chistyakova, 2007; De Meyts, 2016; Plum et al., 2005). Esta fosforilación es acompañada por la fosforilación de los residuos de tirosina de la proteína adaptadora especializada, el sustrato del receptor de la insulina (IRS, del inglés *insulin receptor substrate*), que induce la activación de diferentes vías celulares que regulan un gran abanico de respuestas biológicas (De Meyts, 2016; Plum et al., 2005; Taniguchi et al., 2006) (**Figura 12**).

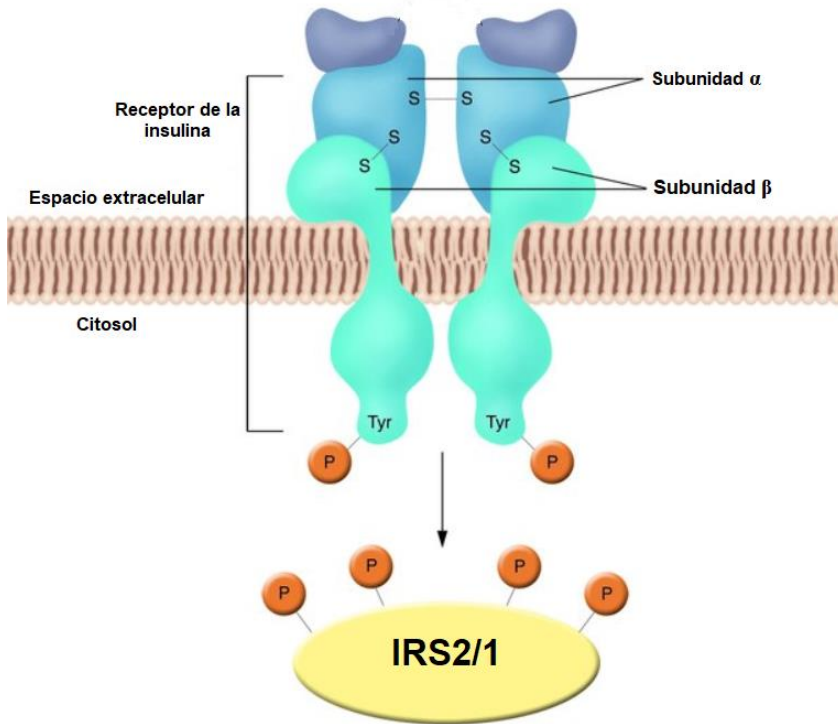


Figura 12: El receptor de la insulina. Fuente: Brady, 2004 (Adaptado).

La familia de las proteínas IRS está formada por seis proteínas de estructura similar (IRS 1-6), con funciones y distribución en los tejidos heterogéneas (Baskin et al., 1993; Lavin et al., 2016). De todas las isoformas de IRS, las más abundantes en el SNC son la IRS1 y la IRS2 (Ghasemi et al., 2013). Por su parte, IRS1 también es importante para el metabolismo muscular y se encuentra en músculo, SNC, hígado, grasa y páncreas. Por otro lado, IRS2, además de en el SNC, se puede encontrar en el músculo esquelético y otros órganos (D. Cai et al., 2003; Kubota et al., 2004; Oliveira et al., 2014). Se ha demostrado que la elevación sostenida de los niveles de insulina reduce la expresión de IRS1 en cultivos neuronales, así como en los tejidos periféricos de ratones, lo que sugiere que IRS1 puede desempeñar un papel crucial en el

desarrollo de la resistencia a la insulina neuronal (Mayer & Belsham, 2010). Al mismo tiempo, se ha demostrado que un *knockout* completo del gen de IRS2 en ratones da lugar a un peso corporal normal, pero también a un encogimiento del cerebro (Martín et al., 2012; Schubert et al., 2003). Estudios adicionales en estos ratones revelaron dos papeles muy importantes para la rama de IRS2 de la vía de la señalización de la insulina en el cerebro. Primero, los ratones *knockout* para IRS2 presentaron una disminución de la proliferación neuronal durante el desarrollo de un 50 %; segundo, la alteración del gen IRS2 provocó la acumulación de ONF en el hipocampo de ratones IRS2^{-/-} de edad elevada, sugiriendo un papel neuroprotector de la señalización de IRS2 en el cerebro (Schubert et al., 2003; Tumminia et al., 2018).

La insulina se une al RI, dando lugar a la fosforilación del mismo y llevando a cabo la activación de dos vías principalmente:

— La vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K, del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*), implicada en el metabolismo de los lípidos y la glucosa (Gabbouj et al., 2019).

— La vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*), implicada de la regulación de la síntesis de proteínas, regulando el crecimiento y la proliferación celular (Saltiel & Kahn, 2001).

En la vía de la señalización de PI3K, cuando se produce la fosforilación del IRS, este fosforila a una de las subunidades del PI3K, denominada p85, produciéndose un cambio conformacional y uniéndose a la subunidad catalítica (p110). Una vez activa, la PI3K fosforila al fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2), convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), que da lugar a la activación de la proteína cinasa B (PKB, del inglés *protein kinase B*) o también denominada AKT, proteína responsable de regular numerosas funciones como la supervivencia celular, la proliferación,

la organización del citoesqueleto, el metabolismo celular, el tráfico de vesículas y el transporte de glucosa, mediante su actuación sobre múltiples dianas (Gabbouj et al., 2019). Entre estas dianas, destaca la proteína GSK3 β , la cual ha sido ampliamente investigada por su relación con la EA (Gabbouj et al., 2019) (Figura 13).

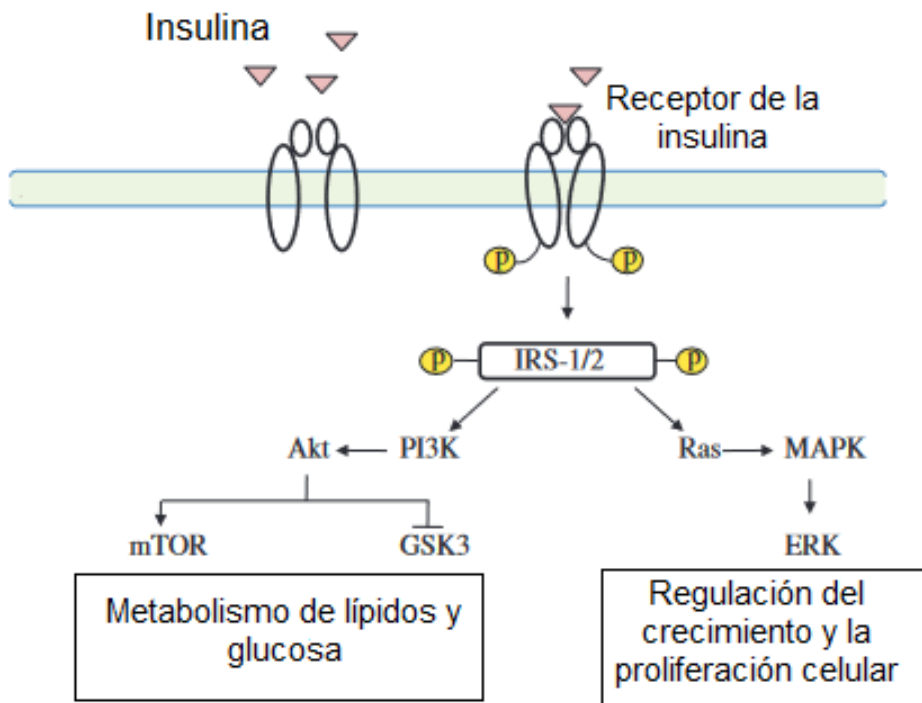


Figura 13: Vía de señalización de la insulina. Fuente: Najem et al., 2014 (Adaptado).

2.4. DMT2 y EA

Desde que las primeras evidencias epidemiológicas del estudio de Rotterdam conectasen la EA con DMT2 hace dos décadas (A. Ott et al., 1996, 1999), la evidencia acumulada ha aportado más apoyo al hecho de que existe una asociación entre ambas patologías. La DMT2 casi duplica el riesgo de

demencia (C.-C. Huang et al., 2014; Ohara et al., 2011), observándose un aumento de la incidencia de EA con la hiperglucemia y la hiperinsulinemia (Baker et al., 2011; T. Matsuzaki et al., 2010). De la misma forma, se ha demostrado que los pacientes con EA tienen un mayor riesgo de padecer DMT2 (Janson et al., 2004; T. Matsuzaki et al., 2010; Vagelatos & Eslick, 2013). Numerosos mecanismos para esta asociación han sido propuestos, incluyendo la resistencia y la deficiencia de insulina, alteraciones en el RI, daños cerebrovasculares e inflamación, entre otros (X. Li et al., 2015). A pesar de ello, no se ha podido llegar a una conclusión sobre cuál es la alteración específica responsable de la predisposición a sufrir EA de los enfermos de DMT2.

2.4.1. La EA como un nuevo tipo de diabetes: «Diabetes tipo 3»

El término «diabetes tipo 3» fue acuñado en 2005 por la Dra. Suzanne de la Monte. Su equipo, examinando cerebros *post mortem* de pacientes con EA, descubrieron que esta enfermedad podría tratarse de una enfermedad neuroendocrina asociada con la señalización de la insulina. El grupo lo denominó «diabetes tipo 3» porque alberga elementos de la DMT1 y la DMT2, ya que se observa tanto una disminución de la producción de insulina como una resistencia a la insulina de los RI (Rivera et al., 2005; Steen et al., 2005). La prueba más sólida que apoya el concepto de diabetes tipo 3 procede de un estudio experimental con ratas que recibieron estreptozotocina mediante inyección intracerebroventricular. Las ratas tratadas con estreptozotocina desarrollaron disfunciones cognitivas caracterizadas por falta de aprendizaje espacial y memoria, resistencia y deficiencia de insulina en el cerebro y neurodegeneración similar a la EA (Lester-Coll et al., 2006; Weinstock & Shoham, 2004).

A pesar de que diferentes autores han proclamado que la EA es la diabetes tipo 3 con una combinación de deficiencia y resistencia a la insulina, los resultados de diferentes estudios siguen sin ser concluyentes, dando lugar a la necesidad de llevar a cabo más investigaciones para obtener resultados más consistentes (H.-G. Kim, 2019).

Papel de la insulina en la patología de la EA

Estudios llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* han mostrado una relación clara entre la insulina y el metabolismo de A β , demostrando que la insulina afecta a ambos: tanto a la producción como a la degradación del péptido (Gasparini et al., 2001, 2002; Phiel et al., 2003; W. Q. Qiu et al., 1998; W. Q. Qiu & Folstein, 2006). La insulina puede elevar los niveles de A β a nivel extracelular mediante la modulación de la actividad de la γ -secretasa (Z. Cai et al., 2015; Phiel et al., 2003) o incrementando su liberación desde las neuronas (Z. Cai et al., 2015; Gasparini et al., 2001, 2002). Además, también se ha observado que la enzima IDE podría ser inhibida competitivamente por la insulina, resultando en una disminución de la degradación del A β (Ma et al., 2015; Pivovarova et al., 2016; W. Q. Qiu et al., 1998; W. Q. Qiu & Folstein, 2006), habiéndose descrito también una disminución de los niveles y de la actividad de esta enzima en animales hiperinsulinémicos (Ho et al., 2004; Pivovarova et al., 2016) (**Figura 14**).

En la EA, la alteración de la vía PI3K-AKT se manifiesta principalmente como una disminución de la fosforilación o de los niveles totales de los componentes de la cascada de señalización (Y. Liu et al., 2011; Steen et al., 2005). Previos estudios han demostrado que los oligómeros de A β inhiben esta vía, mediante la reducción de la unión de la insulina a su receptor y mediante la inhibición de la autofosforilación de este, demostrando que el péptido A β es un inhibidor

competitivo directo de la unión y acción de la insulina (T. Chen et al., 2009; Cheng et al., 2018; Yu & Koh, 2017). Además, el análisis *post mortem* de cerebros con EA reveló una disminución de la fosforilación de las subunidades de PI3K, así como de la fosforilación de AKT y GSK3 β (Moloney et al., 2010; Steen et al., 2005). GSK3 β es una de las cinasas más importantes de Tau (Martin et al., 2013).

Interesantemente, estos cambios estuvieron asociados con varias características patológicas importantes de la EA, como los ONF y la activación de la microglía y la astrogliosis (Rivera et al., 2005). La señalización de la vía PI3K-AKT regula la fosforilación de GSK3 β en la serina 9, lo que provoca la inhibición de su actividad. Tanto *in vivo* como *in vitro*, la insulina ha demostrado ser capaz de reducir la fosforilación de Tau a través de la inhibición de GSK3 β mediada por AKT (El Khoury et al., 2014; M. Hong & Lee, 1997; Hooper et al., 2008) (**Figura 14**).

Por otro lado, como se ha explicado en el apartado anterior, se han observado niveles elevados de marcadores neuroinflamatorios, entre ellos TNF α , en muestras de cerebro y sangre de pacientes con EA, pero también en tejidos periféricos de pacientes con DMT2 (Asslih et al., 2021; Sjöholm & Nyström, 2006). TNF α juega un papel importante en la resistencia a la insulina periférica. Activa a la c-Jun cinasa (JNK, del inglés *Jun N-terminal kinase*), lo que da lugar a la fosforilación inhibitoria de la serina de IRS, bloqueando la señalización de la insulina (Gregor & Hotamisligil, 2011). También se ha observado que los oligómeros de A β son capaces de activar JNK, llevando a cabo una fosforilación inhibitoria de IRS en las neuronas hipocámpales en un modelo de ratón transgénico, hecho que ha sido confirmado tras el estudio *post mortem* de cerebros con EA (Bomfim et al., 2012). En otros estudios, donde se generaron niveles altos de insulina mediante la administración de insulina de

forma aguda a pacientes sanos, se observó un aumento de los niveles de sustancias proinflamatorias, como son $TNF\alpha$, $IL1-\beta$, $IL-6$, en el cerebro (Craft, 2005; Fishel et al., 2005) (Figura 14).

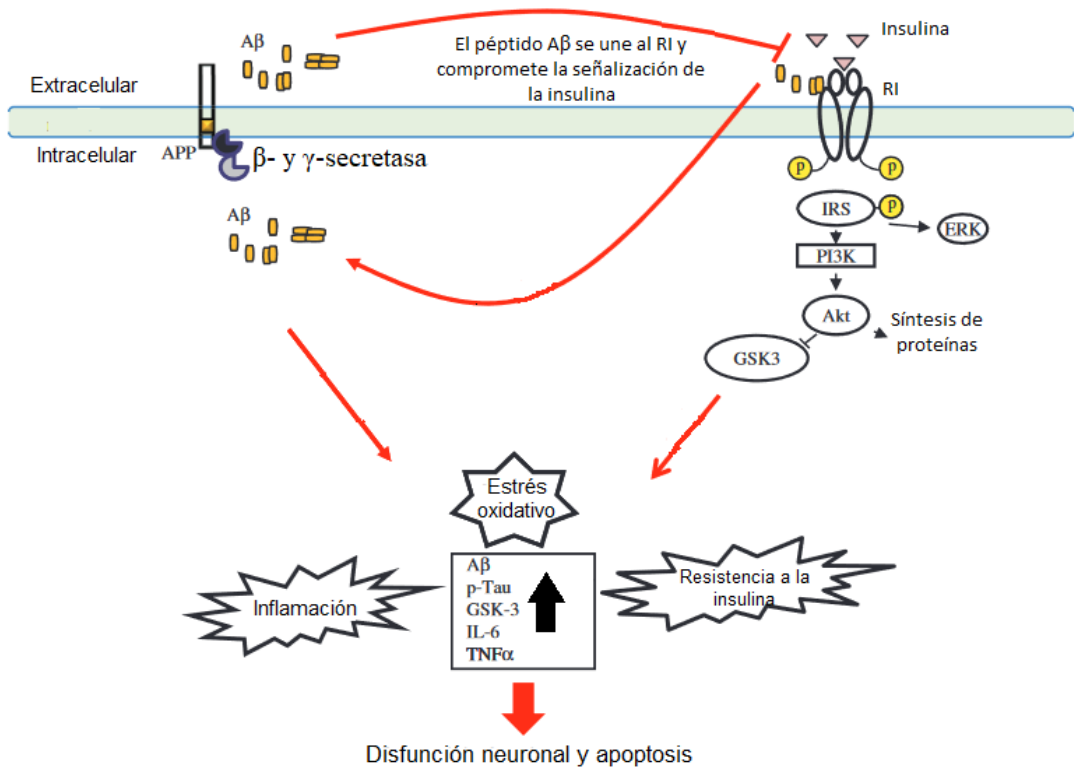


Figura 14: Representación simplificada de la relación entre la resistencia a la insulina, la neuroinflamación y la patología Aβ en la EA. Fuente: Najem et al., 2014 (Adaptado).

En cuanto al papel del sistema colinérgico, este también podría tener una relación con anomalías en los niveles sanguíneos de glucosa y la resistencia a la insulina. Los investigadores mantienen que la insulina participa significativamente en la función neurológica mediante la estimulación de la expresión de ChAT, la enzima responsable de la síntesis de ACh. Por lo tanto, unos niveles subóptimos de insulina, así como una disminución de la sensibilidad de sus receptores, pueden acabar contribuyendo a una disminución

en los niveles de ACh, lo que representa otro posible punto de unión entre diabetes y EA (Jankowska-Kulawy et al., 2022; Rivera et al., 2005).

Otro mecanismo que conecta la diabetes y la EA es que ambas enfermedades están asociadas con un incremento del estrés oxidativo y con la producción de productos finales de glicación (AGEs, del inglés *advanced glycation endproducts*), los cuales pueden generar un daño oxidativo. Estos AGEs son un grupo heterogéneo de moléculas originadas por la glicación y oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, a través de varios pasos químicos a corto y largo plazo (Carvajal Carvajal, 2015). Los AGEs han sido encontrados en vasos sanguíneos de la retina, en nervios periféricos, riñones y en el SNC de diabéticos (C. Ott et al., 2014). Se pueden unir a radicales libres y crear un daño oxidativo, que acaba dando lugar a daño celular (C. Ott et al., 2014; Pasquier et al., 2006; Sato et al., 2006). De esta forma, pacientes diabéticos pueden acabar desarrollando EA debido a la producción de AGEs, la cual puede estar potenciada por el estrés oxidativo propio de esta enfermedad, generando así un círculo vicioso (Pugazhenthii et al., 2017; Sato et al., 2006). Además, también se ha visto que son capaces de modificar las PS y los ONF, favoreciendo su formación (X. Wang et al., 2014; X. Zhu et al., 2007). De esta forma, la detección de los AGEs en plasma o en el líquido cefalorraquídeo podría usarse como un potencial biomarcador temprano de la EA (Erusalimsky, 2021; Takeuchi et al., 2007).

En conclusión, comprender que la EA tiene su fundamento en la neuroendocrinología es una prueba convincente de que debería hacerse mayor hincapié en el diagnóstico precoz de la resistencia a la insulina y la DMT2. Denominar a la EA «diabetes tipo 3» tiene su fundamento en el hecho de que el SNC en la EA está caracterizado por una escasez de insulina y por una resistencia a esta hormona de sus receptores. Esto da lugar a una disfunción

cognitiva, ya que la insulina es crucial para que el proceso de señalización neurológica tenga lugar.

2.5. El receptor PPAR β/δ como nexo entre las alteraciones cognitivas y metabólicas

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs, del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor*) son factores de transcripción activados por ligandos que pertenecen a la familia de los receptores nucleares (Auwerx et al., 1999). Estos receptores son activados por ligandos naturales derivados de lípidos de la dieta, como son ácidos grasos poliinsaturados y sus derivados, y tienen un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa, de los lípidos y de las lipoproteínas, además de en la diferenciación celular, en la inflamación y en el estrés oxidativo (Montaigne et al., 2021). Se han identificado tres isoformas, codificadas por genes diferentes, hasta ahora: PPAR α , PPAR γ y PPAR β/δ . Estos factores de transcripción dependientes de ligando regulan la expresión de genes diana, uniéndose a elementos específicos de respuesta al proliferador de peroxisomas (PPRE, del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor element*) en sitios activadores de genes regulados. Cada receptor se une a su PPRE en forma de heterodímero con un receptor retinoide X (RXR, del inglés *retinoid X receptor*). Al unirse a un agonista, la conformación del PPAR cambia y se estabiliza, de modo que se crea una hendidura de unión y se produce el reclutamiento de coactivadores transcripcionales. El resultado es un aumento de la transcripción génica (J. Berger & Moller, 2002; Christofides et al., 2021).

Recientemente, se ha demostrado que los PPARs son las dianas principales de numerosas clases de compuestos sintéticos usados en el tratamiento exitoso de la diabetes y la dislipidemia, como fibratos, glitazonas o antiinflamatorios no

esteroideos (AINES) (Carvajal et al., 2007; C. K. Tan et al., 2017). El receptor PPAR α se expresa en numerosos tejidos metabólicamente activos como el hígado, el riñón, el corazón y el músculo esquelético (Auboeuf et al., 1997; Braissant et al., 1996); el receptor PPAR γ se distribuye en el tejido adiposo, el corazón, el músculo esquelético, el colon, el intestino, el riñón, el páncreas y el bazo (J. Berger & Moller, 2002; Elbrecht et al., 1996); y, por último, el PPAR β/δ se expresa en un amplio rango de tejidos y células, con relativamente mayores niveles de expresión en el cerebro, el tejido adiposo y la piel (Amri et al., 1995; Braissant et al., 1996).

Diferentes estudios han descrito el posible papel de las isoformas α y γ en la EA y otros desórdenes neurodegenerativos, demostrando su implicación en diferentes eventos patológicos de estas condiciones como son el metabolismo de la proteína APP o la neuroinflamación (Corbett et al., 2015; Lamichane et al., 2018; Vallée & Lecarpentier, 2016; Wójtowicz et al., 2020; H. Zhang et al., 2015).

Sin embargo, el papel del PPAR β/δ en las enfermedades neurodegenerativas sigue sin estar claro, a pesar de ser la isoforma predominante en el SNC adulto. Se ha observado que la falta del receptor PPAR β/δ podría estar relacionado con la neuroinflamación, la resistencia a la insulina en el cerebro, la hiperfosforilación de Tau y un aumento de la actividad de BACE1, factores determinantes en el desarrollo de la EA (Barroso et al., 2013; de la Monte & Wands, 2006; Sáez-Orellana et al., 2020). Además, en el SNC agonistas de este receptor han mostrado mejorar los síntomas clínicos, reduciendo la severidad de una variedad de patologías del SNC mediante la regulación del estrés oxidativo y las respuestas inflamatorias asociadas a estas enfermedades (Tong, Deochand, et al., 2016; Tong, Dominguez, et al., 2016).

Teniendo en cuenta el papel del receptor PPAR β/δ en la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de los carbohidratos, la reducción en el metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina descritos en la EA —así como las evidencias de que esta isoforma podría regular algunas de las características patológicas de la EA—, el receptor PPAR β/δ podría representar una nueva diana terapéutica digna de estudio, donde convergiesen las alteraciones metabólicas y las neurodegenerativas, preservando el metabolismo de los carbohidratos, las vías de sensibilización a la insulina y el rendimiento cognitivo.

3. Tratamiento de la EA

Debido al incremento creciente de los casos de EA en los últimos años y la previsión de que este número siga aumentando exponencialmente en las próximas décadas, la búsqueda de nuevos tratamientos que puedan prevenir y/o curar la enfermedad se ha convertido en una de las prioridades de la investigación mundial actual.

3.1. Terapias actuales de la EA

Actualmente, existen dos tipos de fármacos aprobados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA, del inglés *European Medicine Agency*), y tres tipos aprobados por la *Food and Drug Administration* de los Estados Unidos (FDA), aunque ninguno resulta suficientemente eficaz para el control de la enfermedad. Entre estos tipos destacamos tres inhibidores de la AchE, un antagonista del receptor NMDA, la combinación de un inhibidor de la AchE y del antagonista del receptor NMDA y, finalmente, los controvertidos anticuerpos monoclonales, Aducanumab y Lecanemab (Balazs et al., 2021;

Carvalho et al., 2015; M. Shi et al., 2022; Vecchio et al., 2021). Por otro lado, en China se aprobó en 2019 el nuevo oligomanato sódico. Este compuesto recibió la aprobación por parte de la FDA para comenzar con los ensayos de fase III en 2020, los cuales finalizarán al término de 2024 (X. Wang et al., 2019).

3.1.1. Inhibidores de la AChE

El déficit colinérgico en la EA ha llevado al uso terapéutico de inhibidores reversibles de la AChE. Estos inhibidores, mediante el bloqueo de la enzima, mantienen la viabilidad cerebral de la Ach, pudiendo compensar, aunque no detener, la muerte celular causada por la enfermedad. Pueden dar lugar a una mejora de algunos síntomas cognitivos (memoria, atención) y de comportamiento (apatía, agitación, alucinaciones) durante la fase leve de la enfermedad (Dou et al., 2018). Desafortunadamente, esta capacidad se reduce con la progresión de la misma. Por otro lado, estos inhibidores no están libres de efectos adversos, siendo los más comunes náuseas y, en algunos casos, arritmias cardíacas (Kho et al., 2021; Nordberg & Svensson, 1998). Sin embargo, hoy en día siguen siendo la primera elección en el tratamiento de la EA. Los inhibidores de la AChE que se encuentran actualmente en el mercado son: el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina (**Figura 15**).

El donepezilo fue aprobado en 1996 y es generalmente administrado durante el primer mes de tratamiento en casos de EA de leve a moderada. En 2010, también fue aprobado para la EA de moderada a severa (English, 2012). Entre los efectos adversos más frecuentes destacan la diarrea, calambres musculares y fatiga. Treinta estudios, de 8 257 participantes con EA leve, moderada o severa, han demostrado recientemente que el tratamiento prolongado con donepezilo (de 12 a 24 semanas) da lugar a una mejora de las funciones

cognitivas y a una recuperación de las actividades diarias (Birks & Harvey, 2018).

La rivastigmina fue aprobada para el tratamiento de la EA en el 2000, siendo un inhibidor no competitivo y pseudoirreversible de la AChE y de la butirilcolinesterasa (BuChE), enzima también implicada en la degradación de la ACh. Se usa para el tratamiento de la EA de leve a moderada. El tratamiento con rivastigmina suele conducir a una mayor rehabilitación funcional y global de las habilidades cognitivas y conductuales que con donepezilo (Bullock, 2005; Cumbo & Ligorì, 2014). Se ha observado una buena tolerabilidad (K. Nguyen et al., 2021) y el efecto adverso más frecuente se suele dar a nivel gastrointestinal, razón por la cual la vía de administración suele ser transdérmica (Winblad & Machado, 2008).

La galantamina fue aprobada en 2001 como inhibidor competitivo, rápidamente reversible y potente de la AChE, siendo, además, un modulador alostérico de los receptores nicotínicos, facilitando así también la transmisión colinérgica. Los efectos adversos más frecuentes son náuseas, vómitos, diarrea, dolor gástrico, astenia e insomnio (Vecchio et al., 2021).

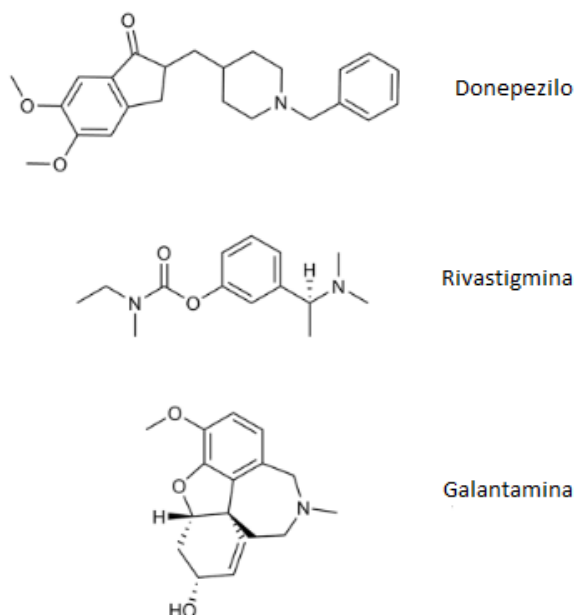


Figura 15: Estructura química de los inhibidores de la AChE que se encuentran en el mercado para el tratamiento de la EA. Fuente: Vecchio et al., 2021 (Adaptado).

3.1.2. Antagonistas de los receptores NMDA: Memantina

Los receptores NMDA son proteínas complejas que actúan como receptores del glutamato. Estos receptores pueden tener una localización sináptica, encontrándose tanto a nivel presináptico como postsináptico y extrasináptico, localizándose en las dendritas y necesitando grandes cantidades de glutamato para ser activados. Se han relacionado con el aprendizaje y la memoria, vinculándose así con la plasticidad neuronal o sináptica (Lai et al., 2014; Paoletti et al., 2013; Shohami & Biegon, 2014).

En condiciones fisiológicas, el glutamato se une al receptor NMDA, que se encuentra bloqueado por el ion Mg^{2+} , para evitar el continuo flujo de iones hacia el interior de la célula. Además de los receptores NMDA, el glutamato también activa a los receptores AMPA, permitiendo el flujo de Na^+ hacia el

espacio intracelular, lo que provoca un cambio en el potencial de membrana. Este cambio en el potencial de membrana provoca el desprendimiento del ion Mg^{2+} , permitiendo la entrada de Ca^{2+} . Además, para su activación, este receptor también necesita la unión de la glicina, que se considera un agonista. En la EA, debido al glutamato y al péptido $A\beta$, se produce una estimulación constante de bajo nivel de los receptores NMDA, generando un cambio en el potencial de membrana, lo que provoca la retirada del ion Mg^{2+} , generando un flujo continuo de iones Ca^{2+} y dando lugar a un «ruido de fondo» de estimulación en reposo. Todo ello provoca la producción de factores neurotóxicos y a la muerte neuronal (Parsons et al., 2013).

La memantina (1-amino-3,5-dimetiladamantano) es un derivado aminoalquilciclohexano. El primer aminoadamantano que se introdujo en el mercado fue la amantadina. Aunque inicialmente se comercializó para la profilaxis de infecciones respiratorias, años después se vio que tenía efectos beneficiosos sobre una gran cantidad de condiciones neurológicas (Tilley & Kramer, 1981). La memantina es estructuralmente muy parecida a la amantidina y fue inicialmente sintetizada al comienzo de la década de los sesenta por la compañía ELI Lilly como agente hipoglucemiante para el tratamiento de la DMT1 (Gerzon et al., 1963; Rogawski & Wenk, 2003). Sin embargo, tiempo después se comprobó que carecía de dicha actividad y que presentaba propiedades que la convertían en candidata para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas al bloquear los receptores NMDA (Alam et al., 2017; Parsons et al., 1999).

La memantina se une al receptor de manera no competitiva, con una afinidad moderada y de manera voltaje-dependiente, lo que significa que a niveles moderados de estimulación prolongada (en condiciones patológicas) la memantina continúa bloqueando al receptor, a diferencia del ion Mg^{2+} , cuya

unión es más débil (Parsons et al., 1993, 2007, 2009). Sin embargo, cuando se produce la llegada de una señal fisiológica generando un aumento pasajero de los niveles de glutamato, la memantina se disocia del receptor, dando lugar a una neurotransmisión normal (Frankiewicz & Parsons, 1999; Parsons et al., 2009). De esta manera, en la EA, la memantina sería capaz de reducir el «ruido de fondo» patológico debido a la señalización disfuncional del glutamato, permitiendo una mayor capacidad para distinguirlo de las señales fisiológicas (Danysz & Parsons, 2003).

La memantina ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que este efecto se traduce en una reversión de las alteraciones del aprendizaje inducidas por la sobreactivación de los receptores NMDA (Alam et al., 2017; Zajaczkowski et al., 1997), siendo indicada para el tratamiento de pacientes con EA de moderada a grave y habiendo demostrado un efecto significativo en la mejora de los síntomas en varios estudios clínicos controlados a gran escala (Alam et al., 2017; Reisberg et al., 2003; Tariot et al., 2004; Winblad et al., 2007).

3.1.3. Nuevas terapias: Aducanumab, Lecanemab y oligomanato sódico

El 7 de junio de 2021 la FDA aprobó en Estados Unidos el uso del anticuerpo monoclonal Aducanumab para el tratamiento de casos leves de EA o casos de demencia leve (Dhillon, 2021). La indicación inicial del Aducanumab se actualizó respecto a la anterior, en la que estaba indicado para todos los pacientes con EA (J. Cummings et al., 2021). Este anticuerpo lleva a cabo su mecanismo de acción tras atravesar la BHE, donde se dirige y une selectivamente a los oligómeros solubles y fibrillas insolubles de A β en el cerebro (Kastanenka et al., 2016; Sevigny et al., 2016). Sin embargo, esta aprobación ha venido acompañada de una gran controversia, ya que en los ensayos clínicos desarrollados no se obtuvieron resultados claros de eficacia, de manera que su aprobación acabó con la dimisión de tres miembros del

consejo asesor de la FDA (Mahase, 2021). Esta decisión reglamentaria requiere de más ensayos de confirmación (fase IV) para verificar que el efecto del fármaco en los criterios de valoración predice un beneficio clínicamente significativo (Khachaturian, 2022). Esta controversia, que acompañó a la aprobación del Aducanumab por la FDA, se hizo mayor cuando la EMA comunicó en el mes de diciembre de 2021 que no autorizaría la comercialización en Europa de este nuevo tratamiento, basándose en los pobres resultados de eficacia de la fase III de los ensayos clínicos y afirmando que la evidencia científica que aportaban no era suficiente para apoyar que esta terapia fuese efectiva para el tratamiento de la EA leve (EMA,2021).

El 6 de enero de 2023, la FDA aprobó en Estados Unidos otro anticuerpo monoclonal, Lecanemab, indicado para pacientes con EA y demencia leve y con patología de A β confirmada (Hoy, 2023). Su mecanismo de acción es distinto al de otros agentes antiamiloides, ya que presenta una gran selectividad hacia los agregados solubles de A β en comparación con las especies monoméricas, así como una selectividad moderada frente al amiloide fibrilar. Se cree que este perfil supone una ventaja para atacar selectivamente las especies de A β más tóxicas (Swanson et al., 2021). Al igual que ocurrió con su hermano, el Aducanumab, este fármaco se ha aprobado por la vía de «aprobación acelerada», reservada para los tratamientos de enfermedades para las que apenas existen tratamientos y en la que no se exigen datos de ensayos clínicos de fase III.

Los investigadores se muestran esperanzados con los resultados que se obtuvieron en la fase III, publicados en noviembre de 2022 (van Dyck et al., 2023). Este estudio, en el que participaron unas 1 800 personas con EA incipiente, mostró que Lecanemab era capaz de ralentizar el deterioro cognitivo en un 27 % durante los 18 meses de tratamiento. Sin embargo, como

se ha dicho anteriormente, la decisión de la FDA fue tomada sin los datos de la fase III. En el estudio de fase II, se observó que el fármaco era capaz de reducir las placas amiloideas en 856 pacientes, pero no evaluó si esa disminución venía acompañada de una mejora cognitiva (Swanson et al., 2021). No está claro cómo afectará a los pacientes esa mejora cognitiva observada del 27 % ni si ese efecto se mantendrá pasados los 18 meses: para ello habrá que seguir investigando. De momento, la FDA ha declarado que debe usarse únicamente en personas con deterioro cognitivo leve, es decir, el mismo perfil usado en los ensayos clínicos. No obstante, en los últimos meses se ha informado de la muerte de tres personas inscritas en la fase III del ensayo. Según estos informes, los pacientes podrían haber muerto debido a que el anticuerpo debilitó los vasos sanguíneos del cerebro al atacar las placas de A β que los recubren. Todos los pacientes se encontraban en tratamiento con anticoagulantes, lo que pudo haber agravado la hemorragia, de manera que algunos científicos creen que se podría estar poniendo en peligro innecesariamente a personas con un deterioro cognitivo leve, mientras que la empresa farmacéutica sostiene que no es apropiado sacar conclusiones basándose en casos individuales. En Europa, Japón y China, actualmente Lecanemab se encuentra en el proceso de revisión por las diferentes entidades reguladoras (Hoy, 2023).

En noviembre de 2019 se aprobó en China un nuevo tratamiento para la EA de leve a moderada para mejorar la función cognitiva (Syed, 2020): el oligomanato sódico (GV-971). Se trata de una mezcla administrada oralmente de oligosacáridos lineales ácidos derivados de algas marrones marinas, desarrollado por la farmacéutica Green Valley (X. Wang et al., 2019). Aunque el mecanismo completo sigue sin conocerse, ha demostrado reducir la neuroinflamación mediante la alteración notable de la composición de la microbiota intestinal y la regulación del metabolismo de aminoácidos, lo que

puede limitar la contribución de la alteración de la inmunidad periférica a la patogénesis de la EA. En concreto, junto con la deposición de A β y la fosforilación de Tau, la alteración de la microbiota intestinal durante la progresión de la EA provoca trastornos metabólicos. La producción anormal de metabolitos provoca inflamación periférica y aumenta la infiltración cerebral de células inmunitarias que interactúan con las células microgliales en el cerebro, lo que da como resultado neuroinflamación patológica y deterioro cognitivo. La administración oral del oligomanato sódico reacondiona la microbiota intestinal, normaliza los metabolitos, reduce la infiltración de células inmunitarias periféricas en el cerebro, resuelve la neuroinflamación y reduce la deposición de A β y la fosforilación de Tau, con la consiguiente mejora de las funciones cognitivas (X. Wang et al., 2019). Además, también es capaz de atravesar la BHE a través de transportadores, incluyendo al GLUT1. De esta forma, participa directamente en la disminución de la fosforilación de Tau y es capaz de unirse a múltiples subregiones de A β para inhibir la formación de fibrillas de este péptido y desestabilizar las fibrillas preformadas en monómeros no tóxicos, resultando en una mejora del aprendizaje (X. Wang et al., 2019).

El 8 de abril de 2020, Shangai Green Valley recibió luz verde por parte de la FDA para llevar a cabo el estudio clínico internacional, multicéntrico, de fase III GV-971. Este ensayo se completará en 2024, y la presentación de solicitud de registro de nuevo fármaco se espera para 2025.

3.2. Las moléculas multidiana como nueva estrategia para el tratamiento de la EA: Rheina-Huprina

Como se ha podido ver hasta ahora, existen una gran cantidad de complejos mecanismos implicados en el entramado patológico de la EA. Debido a la

incapacidad de las terapias actuales para frenar el avance de la enfermedad, se ha hecho patente el fracaso del pensamiento clásico del desarrollo de nuevas terapias de una molécula por diana. Consecuentemente, se necesita un enfoque farmacológico más completo y complejo con el fin de obtener tratamientos eficaces.

En este contexto, diferentes aproximaciones farmacológicas ofrecen alternativas para poder solucionar el problema de usar fármacos con una sola diana terapéutica para tratar enfermedades tan complejas como la EA. La estrategia más usada es la conocida como «terapia multimedicación», que consiste en usar una combinación de más de un fármaco con diferente mecanismo de acción. Esta terapia tiene distintos inconvenientes, como la biodisponibilidad, las interacciones entre fármacos o incluso la falta de cumplimiento por parte del paciente, sobre todo en el caso de pacientes con EA. Otra estrategia sería la «medicación de múltiples compuestos», que consiste en la adición de diferentes compuestos a la misma formulación, dando lugar a una simplificación de los regímenes de dosificación y, por lo tanto, a una mejor adhesión al tratamiento por parte del paciente, pero sigue ocasionando el resto de los problemas mencionados anteriormente (Carocci et al., 2018; Schmitt et al., 2004).

Finalmente, ha surgido una tercera estrategia: desarrollar fármacos que sean capaces de atacar varias dianas al mismo tiempo. Esta estrategia, conocida como «terapia con ligandos dirigida a múltiples dianas», tiene numerosas ventajas, como una farmacocinética más simple, una mayor eficacia gracias al efecto sinérgico de la modulación de diferentes dianas y una mayor seguridad, ya que se reduce el número de efectos secundarios y también de interacciones entre fármacos (Morphy & Rankovic, 2005; Neddenriep et al., 2011). Sin embargo, a la hora de diseñar estos compuestos hay que tener diferentes puntos

en cuenta: primero, que el compuesto multidiana sea capaz de interactuar de manera comparable o equilibrada con las diferentes dianas; segundo, siempre hay que tener en cuenta la promiscuidad potencial de estos fármacos como resultado de efectos no deseados, provocando, todo ello, que el diseño de los mismos sea un proceso muy complejo (Anighoro et al., 2014; Viayna et al., 2013). Aun así, esta nueva estrategia representa una nueva oportunidad esperanzadora para el desarrollo de fármacos que sirvan para el tratamiento de enfermedades multifactoriales como la EA.

Una de las moléculas líderes que se usan hoy en día para el diseño de moléculas multidiana es la tacrina. La tacrina fue identificada como el primer inhibidor de la AChE que recibió la aprobación para el tratamiento sintomático de la EA (Crismon, 1994). Sin embargo, a finales de los años noventa, fue retirada del mercado debido a su hepatotoxicidad (Watkins et al., 1994; Zeiger et al., 1997). A pesar de ello, actualmente se sigue usando para el diseño y desarrollo de nuevos derivados con perfiles toxicológicos mejorados y/o propiedades farmacológicas adicionales (Spilovska et al., 2017; W.-Y. Wu et al., 2017).

Otra molécula para destacar es la huperzina A, un alcaloide nootrópico aislado de la planta medicinal china *Huperzia serrata*. Es un potente inhibidor reversible de la AChE (Williams et al., 2011) que puede modificar otros sistemas neurotransmisores para mejorar la memoria, confiriendo protección frente a la proteína A β y radicales libres (Howes et al., 2017; Xiao et al., 2002). Esta molécula es clínicamente usada en China para el tratamiento de la EA y se ha comercializado en otros lugares como suplemento alimenticio gracias a su habilidad para mejorar la memoria y la función mental (Howes et al., 2017).

Como resultado de la unión de estas dos moléculas, se ha dado lugar a una familia de compuestos, las huprininas, como potentes inhibidores de la AChE, de hecho, en muchos casos, siendo más potentes que las moléculas originales.

Se distinguen dos compuestos líderes designados como primera generación, huprina Y y la huprina X (Mezeiova et al., 2020) (**Figura 16**). Se ha visto que estas moléculas tienen un perfil único que abarca efectos modificadores de la EA tanto colinérgicos como no colinérgicos, y, por tanto, constituyen prometedores candidatos a fármacos para esta enfermedad (Muñoz-Torrero & Camps, 2008).

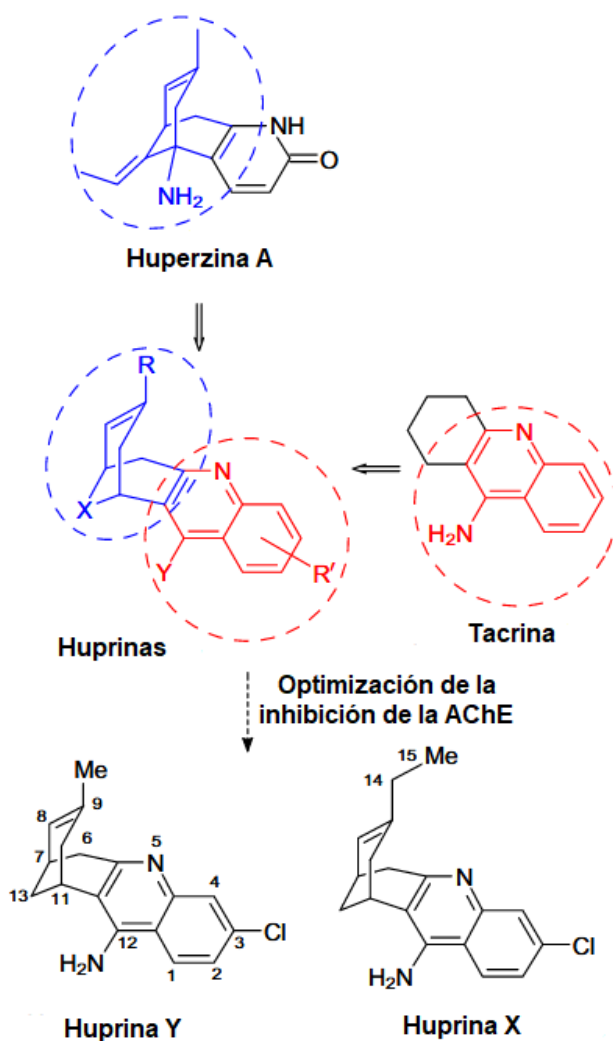


Figura 16: Diseño de huprinas a partir de la huperzina A y la tacrina. Fuente: Mezeiova et al., 2020 (Adaptado).

Viayna y colaboradores han desarrollado recientemente un híbrido multidiana conocido como rheina-huprina (RHE-HUP) (Pérez-Areales et al., 2017). Este combina los farmacóforos de rheina y huprina Y. La rheina es un producto natural encontrado en el ruibarbo medicinal de la medicina tradicional china, el cual es bien tolerado en humanos (X. Yang et al., 2011) y se encuentra estructuralmente relacionada con algunas hidroxiantraquinonas con actividad

antiagregante de Tau. Por otro lado, la huprina Y, como se ha descrito previamente, es un potente inhibidor de la AChE. En conjunto, la molécula RHE-HUP ha demostrado tener una fuerte actividad *in vitro* como inhibidora de sus principales dianas, que son la agregación de Tau y la AChE, pero también demostró tener una fuerte actividad inhibidora de BACE1. Además, *in vivo*, este compuesto ha demostrado tener capacidad para disminuir los niveles de A β , la fosforilación de Tau y el deterioro cognitivo. De esta forma, RHE-HUP emerge como un candidato multidiana muy prometedor para el tratamiento de la EA (Serrano et al., 2016) (Figura 17).

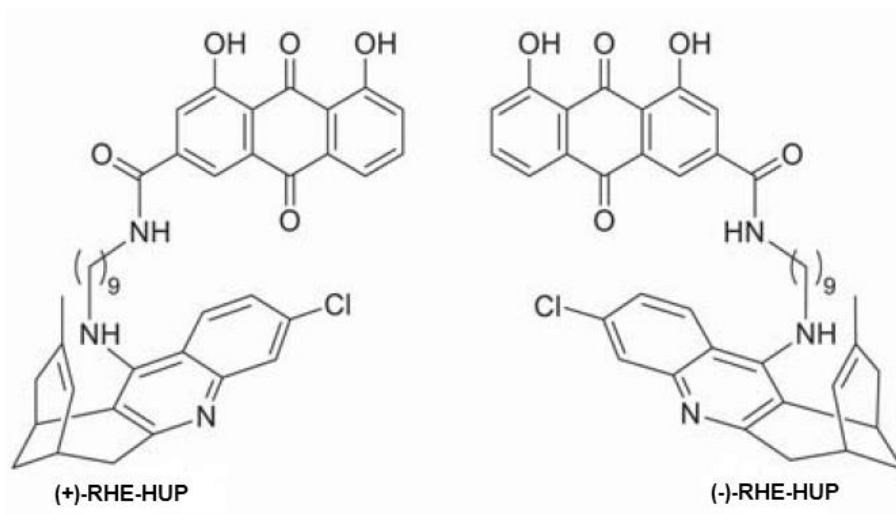


Figura 17: Estructura química de los derivados (+) y (-) de RHE-HUP. Fuente: Serrano et al., 2016 (Adaptado).

4. Modelos experimentales de ratón para el estudio del déficit cognitivo y la EA en presencia de alteraciones metabólicas

Los modelos animales son una de las herramientas más importantes en la investigación de nuevos tratamientos de la EA. Sin embargo, muchos de los tratamientos potenciales que han fallado en las fases clínicas en los últimos años habían mostrado resultados prometedores en modelos animales (van Dam et al., 2003). Los primeros modelos de animales transgénicos para el estudio de la EA que se generaron expresaban la proteína APP humana y, aunque presentaban producción del péptido A β , no mostraban la neuropatología característica (Puzzo et al., 2015). A pesar de que hoy en día todavía no existan modelos de ratón que presenten todas las características típicas de la enfermedad, se han conseguido generar modelos resultado de la combinación de mutaciones que generan algunas de las características patológicas más importantes de la EA con el fin de aproximarse a ella, basándose, entre otras, en la proteína APP humana o en Tau (Games et al., 2006). Por otro lado, también se han desarrollado otros modelos animales, con el objetivo de describir nuevas posibles dianas farmacológicas para el tratamiento del deterioro cognitivo y la EA.

Modelo knock out PPAR β / δ ^{sex4}

El gen PPAR β / δ fue modificado en células madre embrionarias mediante la recombinación homóloga con un vector de sustitución, utilizando un enfoque basado en la selección positiva-negativa. En este vector, las secuencias genómicas que codifican el dominio de unión al ADN del receptor (exón 4 y parte del exón 5) se sustituyeron por un casete PGK-neo (Nadra et al., 2006).

Está descrito que estos ratones presentan deterioro cognitivo en una prueba de reconocimiento de objetos junto con un aumento de la expresión de IL-6, de la fosforilación de Tau y de los niveles de BACE1 y RAGE, implicados en la síntesis del péptido A β y su deposición. Los niveles proteicos de GFAP se ven también incrementados en la corteza de este modelo de ratón, sugiriendo la presencia de astrogliosis (Barroso et al., 2013; Kalinin et al., 2009). Aunque numerosos estudios han demostrado que los agonistas de este receptor podrían tener efectos interesantes para el tratamiento de la EA, el mecanismo de acción sigue sin esclarecerse. Por ello, este modelo brinda el marco ideal para conocer el papel de este receptor en el desarrollo de alteraciones cognitivas/metabólicas, con el objetivo de diseñar moléculas más selectivas para intentar frenar el avance de los acontecimientos que pueden acabar, eventualmente, en el desarrollo de EA.

Modelo APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP/PS1)

Este modelo de ratón, descrito por Jankowsky y colaboradores en 2004, sobreexpresa la mutación sueca de APP, junto con la delección del exón 9 de la PS1, siendo generado mediante la coinyección de ambos transgenes, de manera que la descendencia la hereda como un único transgén (Jankowsky et al., 2004). La sobreexpresión del transgén conduce a la sobreproducción de A β , tanto de A β ₄₀ como de A β ₄₂, siendo este último el más frecuente y el principal componente de las PS, que aparecen alrededor de los tres meses de edad, comenzando la deposición en la corteza y avanzando hacia otras zonas del cerebro. Además, estas placas aparecen rodeadas de microglía activada y astrocitos. A los doce meses de edad, aunque se puede ver incluso a los seis meses, los ratones presentan déficits en una gran cantidad de pruebas de comportamiento, como el test del laberinto de agua de Morris (MWM, del inglés *Morris Water Maze*) (Xiong et al., 2011).

Pero, además, estos ratones presentan otros síntomas clínicamente relevantes similares a los de la EA, entre los que se incluyen: anomalías neuríticas leves (García-Alloza et al., 2010), pérdida de actividad neuronal relacionadas con la presencia de PS (Meyer-Luehmann et al., 2009) y déficits de la transmisión colinérgica a nivel pre y postsináptico (Machová et al., 2010). Debido a que este modelo presenta la patología de A β y evidencias de déficits de memoria a los seis meses de edad (Xiong et al., 2011), representa una valiosa herramienta en aquellos estudios que tienen el objetivo de desarrollar nuevas terapias centradas específicamente contra las placas y la neuroinflamación asociada (Figura 18).

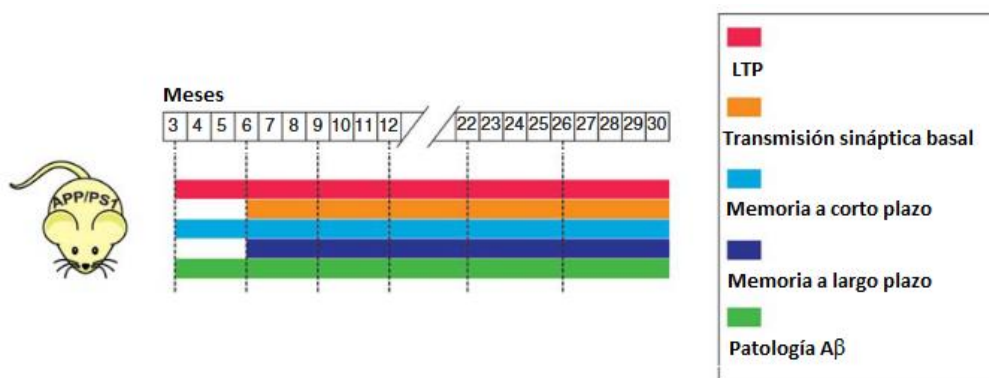


Figura 18: Diagrama que muestra la aparición y progreso del deterioro sináptico, la pérdida de memoria y la patología A β en el modelo de ratón APP/PS1. Fuente: Puzzo et al., 2015 (Adaptado).

Otro aspecto a considerar son las diferencias de sexo en el riesgo de padecer EA —como se ha descrito anteriormente— las mujeres tienen una mayor incidencia (Bachman et al., 1992; Hebert et al., 2001; Laws et al., 2016) y prevalencia (Jorm & Jolley, 1998; Laws et al., 2016; Ruitenbergh et al., 2001) de esta enfermedad. Cuando se han estudiado las diferencias en cuanto a sexo en este modelo de ratón se ha visto que las hembras presentan una mayor carga de A β , patología de Tau, neuroinflamación y pérdida de neuronas y sinapsis

(S.-S. Jiao et al., 2016), convirtiendo a las hembras de este modelo en una mejor aproximación de la enfermedad.

Combinación de los modelos APP/PS1 y PPAR β / δ ^{-/-} con una dieta rica en grasa

Como se ha ido mencionando a lo largo de la presente tesis doctoral, la DMT2 es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de la EA. Se ha visto como una situación de hiperglucemia, hiperinsulinemia y de resistencia a la insulina (características de la DMT2) puede provocar alteraciones en la vía de la señalización de la insulina a nivel del SNC. Además, la resistencia a la insulina a nivel central también ha sido relacionada con una disminución del metabolismo de la glucosa (Baker et al., 2011; Roberts et al., 2014), observándose un hipometabolismo de esta molécula en el cerebro incluso años antes de la aparición de la demencia en enfermos de DMT2 (Langbaum et al., 2009; Minoshima et al., 1997). Asimismo, como se ha especificado en el apartado «Papel de la insulina en la patología de la EA», una afectación de la vía de la insulina a nivel central se ha relacionado con un aumento de la deposición de A β , de la hiperfosforilación de Tau, de la neuroinflamación e incluso de la transmisión colinérgica, todos ellos importantes eventos patológicos de la EA.

En este sentido, la DMT2 inducida por una dieta rica en grasa se ha visto que es capaz de favorecer la amiloidogénesis tanto de los péptidos A β ₄₀ como A β ₄₂, así como de aumentar la fosforilación de Tau y de dar lugar a una alteración de la función cognitiva en modelos de ratón de EA (Ho et al., 2004; Mehla et al., 2014). Sin embargo, a pesar de esta aparente clara relación no siempre que se da esta enfermedad neurodegenerativa existe una resistencia periférica a la

insulina, por lo que el mecanismo que une estas dos patologías todavía debe ser esclarecido.

Es por todo ello que la combinación del modelo de ratón PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ con una dieta rica en grasa generaría un modelo de resistencia a la insulina a nivel periférico que permitiría conocer el papel de este receptor en la relación entre las alteraciones cognitivas/metabólicas, pudiendo valorar su papel como posible diana terapéutica, incluso en estadios previos a la aparición de EA. Por otro lado, la combinación de esta dieta con el modelo APP/PS1, el cual presenta las características patológicas de la EA, daría lugar a un modelo animal con la doble patología, ideal para estudiar la relación entre ambas enfermedades (Amelianchik et al., 2022; J. M. Walker et al., 2017).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Basada en la información descrita en la introducción y en previos estudios realizados por nuestro grupo, la hipótesis de esta tesis es, por un lado, que la falta del receptor PPAR β/δ tiene un papel clave en el desarrollo del déficit cognitivo y que la asociación con una dieta rica en grasa exacerba esta condición, y, por otro lado, que el híbrido RHE-HUP representa un prometedor candidato para el tratamiento de la EA en presencia de alteraciones metabólicas, debido a su perfil multidiana dirigido contra algunos de los principales eventos patogénicos de la EA.

Se han definido los siguientes objetivos generales:

1. Evaluar las consecuencias de la falta del receptor PPAR β/δ sobre las vías neuropatológicas implicadas en el déficit cognitivo en ratones *knock out* para el gen *PPARD* de seis meses de edad y determinar si la ingesta de una dieta rica en grasa deteriora este estado patológico. En concreto:
 - Determinar el efecto sobre el peso, la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina, así como la implicación en la alteración de la vía de señalización de la insulina a nivel hipocampal.
 - Evaluar los cambios inducidos sobre el número de espinas dendríticas, marcadores sinápticos y sobre la memoria de reconocimiento.
 - Investigar los efectos sobre la neuroinflamación a nivel hipocampal a través del estudio de distintos marcadores neuroinflamatorios.

2. Evaluar los efectos sobre las principales vías relacionadas con la EA, tanto a nivel central como periférico, del compuesto híbrido RHE-HUP en ratones hembra APP/PS1 de seis meses de edad expuestos a una dieta rica en grasa. En concreto:
 - Evaluar las consecuencias sobre parámetros periféricos relacionados con el metabolismo.
 - Determinar el efecto en la vía de señalización de la insulina cerebral y la hiperfosforilación de Tau.
 - Estudiar la actividad sobre la deposición de placas de A β a nivel hipocampal y cortical.
 - Evaluar los efectos sobre la neuroinflamación.
 - Determinar las consecuencias sobre biomarcadores sinápticos, así como su papel en la mejora del proceso cognitivo.

RESULTADOS

Publicación I

Peroxisomal proliferator-activated receptor β/δ deficiency induces cognitive alterations

Triana Espinosa-Jiménez^{1,2,3}, Oriol Busquets⁴, Amanda Cano^{2,5,6,7}, Elena Sánchez-López^{2,5,6,8}, Ester Verdaguer^{2,3,9}, Antoni Parcerisas¹⁰, Jordi Olloquequi¹¹, Carme Auladell^{2,3,9}, Jaume Folch^{2,12}, Walter Wahli^{13,14,15}, Manuel Vázquez-Carrera^{1,16,17}, Antoni Camins^{1,2,3}, Miren Ettcheto^{1,2,3}.
Frontiers in pharmacology, 2022, p. 2435.

doi: 10.3389/fphar.2022.902047

JCR 2021 IF: 5,988

Afiliaciones:

¹ Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

² Biomedical Research Networking Centre in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain.

³ Institute of Neuroscience, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

⁴ Dominick P. Purpura Department of Neurosciences; Albert Einstein College of Medicine; New York City (10461), United States.

⁵ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

⁶ Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

⁷ Research Center and Memory Clinic, Fundació ACE. Institut Català de Neurociències Aplicades - International University of Catalunya (UIC), Barcelona, Spain.

⁸ Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, IQAC-CSIC, 08034 Barcelona, Spain.

⁹ Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

¹⁰ Departament of Basic Sciences, Universitat Internacional de Catalunya (UIC), Sant Cugat del Vallès.

¹¹ Department of biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

¹² Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Medicine and Life Science, University Rovira i Virgili, Reus, Spain.

¹³ Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

¹⁴ Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University Singapore, Singapore 308232.

¹⁵ ToxAlim (Research Center in Food Toxicology), INRAE, UMR1331, Toulouse Cedex, France.

¹⁶ Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

¹⁷ Spanish Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Resumen

El PPAR β/δ se trata del más abundante en el SNC y está implicado en la homeostasis microglial y el metabolismo. Además, las alteraciones en este receptor parecen tener un papel clave en el deterioro de la memoria. Aunque la función del PPAR β/δ en el metabolismo está bien descrita, su contribución en los procesos neuronales y de memoria se encuentran poco explorados.

De esta forma, el objetivo del presente estudio es determinar el papel del receptor PPAR β/δ en las vías neuropatológicas implicadas en la pérdida cognitiva, y elucidar si un factor de riesgo implicado en la pérdida de la memoria, como es la obesidad, modula estos marcadores neuropatológicos. Para ello, se usaron ratones macho de 6 meses de edad knock-out totales para el gen *Ppard* de origen genético C57BL/6X129/SV (PPAR $\beta/\delta^{-/-}$) y ratones wild-type (WT) con el mismo origen genético. Tras el destete, a los 21 días, y durante toda su vida, los animales fueron alimentados bien con dieta control o con una dieta rica en grasa.

Nuestros resultados mostraron una disminución en la densidad de espinas dendríticas y en marcadores sinápticos en los ratones PPAR $\beta/\delta^{-/-}$, resultados que fueron corroborados con el test de reconocimiento del objeto nuevo (NORT, del inglés *novel object recognition test*). Además, este estudio demostró que la falta de este receptor producía un aumento de la gliosis en el hipocampo, contribuyendo a la activación astrocítica y microglial junto con el aumento de marcadores de neuroinflamación. Igualmente, se encontraron alteraciones en la vía del receptor de la insulina a nivel hipocampal. Interesantemente, mientras que algunas alteraciones causadas por la falta del receptor PPAR β/δ no se vieron afectadas por la alimentación con la dieta rica en grasa, otras sufrieron una exacerbación o necesitaron la combinación de ambos factores.

De esta forma, los resultados derivados de este estudio sugieren que la falta del receptor PPAR β/δ afecta a la estructura neuronal y sináptica, contribuyendo a la disfunción de la memoria, presentando a este receptor como una posible nueva diana para el tratamiento del deterioro de la memoria.



Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor β/δ Deficiency Induces Cognitive Alterations

Triana Espinosa-Jiménez^{1,2,3}, Oriol Busquets⁴, Amanda Cano^{2,5,6,7}, Elena Sánchez-López^{2,5,6,8}, Ester Verdaguer^{2,3,9}, Antoni Parcerisas¹⁰, Jordi Ollaquequi¹¹, Carme Auladell^{2,3,9}, Jaume Folch^{2,12}, Walter Wahl^{13,14,15}, Manuel Vázquez-Carrera^{1,16,17}, Antoni Camins^{1,2,3} and Miren Etxcheto^{1,2,3*}

¹Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ²Biomedical Research Networking Centre in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain, ³Institute of Neuroscience, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ⁴Dominick P. Purpura Department of Neurosciences, Albert Einstein College of Medicine, New York City, NY, United States, ⁵Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona, Barcelona, Spain, ⁶Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ⁷Research Center and Memory Clinic, Fundació ACE Institut Català de Neurociències Aplicades—International University of Catalunya (IUC), Barcelona, Spain, ⁸Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, IQAC-CSIC, Barcelona, Spain, ⁹Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ¹⁰Departament de Basic Sciences, Universitat Internacional de Catalunya (IUC), Sant Cugat del Vallès, Spain, ¹¹Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ¹²Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Medicine and Life Science, University Rovira i Virgili, Reus, Spain, ¹³Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland, ¹⁴Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University, Singapore, Singapore, ¹⁵ToxAlm (Research Center in Food Toxicology), INRAE, Toulouse Cedex, France, ¹⁶Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Spain, ¹⁷Spanish Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Ahmad Reza Dehpour,
Tehran University of Medical
Sciences, Iran

Reviewed by:

Victor Alan Gault,
Ulster University, United Kingdom
Jessica Jarnasz,
University of Manitoba, Canada

*Correspondence:

Miren Etxcheto
mirenetxcheto@ub.edu

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 22 March 2022

Accepted: 06 June 2022

Published: 11 July 2022

Citation:

Espinosa-Jiménez T, Busquets O,
Cano A, Sánchez-López E,
Verdaguer E, Parcerisas A,
Ollaquequi J, Auladell C, Folch J,
Wahl W, Vázquez-Carrera M,
Camins A and Etxcheto M (2022)
Peroxisomal Proliferator-Activated
Receptor β/δ Deficiency Induces
Cognitive Alterations.
Front. Pharmacol. 13:902047.
doi: 10.3389/fphar.2022.902047

Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ), the most PPAR abundant isotype in the central nervous system, is involved in microglial homeostasis and metabolism, whose disturbances have been demonstrated to play a key role in memory impairment. Although PPAR β/δ function is well-established in metabolism, its contribution to neuronal and specifically memory process is underexplored. Therefore, the aim of the study is to determine the role of PPAR β/δ in the neuropathological pathways involved in memory impairment and as to whether a risk factor implicated in memory loss such as obesity modulates neuropathological markers. To carry out this study, 6-month-old total knock-out for the *Ppard* gene male mice with C57BL/6X129/SV background (PPAR $\beta/\delta^{-/-}$) and wild-type (WT) littermates with the same genetic background were used. Animals were fed, after the weaning (at 21 days old), and throughout their growth, either conventional chow (CT) or a palmitic acid-enriched diet (HFD). Thus, four groups were defined: WT CT, WT HFD, PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ CT, and PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ HFD. Before sacrifice, novel

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; AKT/p-AKT, protein kinase B/phospho-protein kinase B; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CNS, central nervous system; CT, conventional chow; DBN1, drebrin 1; DG, dentate gyrus; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GSK3 β /p-GSK3 β , glycogen synthase kinase 3 beta; GTT, glucose tolerance test; HFD, high-fat diet; IBA1, ionized calcium-binding adapter molecule 1; IR, insulin receptor; ITT, insulin tolerance test; KO, knock-out; MWM, Morris Water Maze; NFK β , nuclear factor kappa B; NORT, novel object recognition test; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; PB, phosphate buffer; PFA, paraformaldehyde; PPARs, peroxisome proliferator-activated receptors; PSD95, density protein 95; PTP1B, protein tyrosine phosphatase; T2DM, type 2 Diabetes Mellitus; TLR4, Toll-like receptor 4; WT, wild type.

object recognition test (NORT) and glucose and insulin tolerance tests were performed. After that, animals were sacrificed by intracardiac perfusion or cervical dislocation. Different techniques, such as GolgiStain kit or immunofluorescence, were used to evaluate the role of PPAR β/δ in memory dysfunction. Our results showed a decrease in dendritic spine density and synaptic markers in PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ mice, which were corroborated in the NORT. Likewise, our study demonstrated that the lack of PPAR β/δ receptor enhances gliosis in the hippocampus, contributing to astrocyte and microglial activation and to the increase in neuroinflammatory biomarkers. Additionally, alterations in the hippocampal insulin receptor pathway were found. Interestingly, while some of the disturbances caused by the lack of PPAR β/δ were not affected by feeding the HFD, others were exacerbated or required the combination of both factors. Taken together, the loss of PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ affects neuronal and synaptic structure, contributing to memory dysfunction, and they also present this receptor as a possible new target for the treatment of memory impairment.

Keywords: PPAR β/δ , memory impairment, high-fat diet, neuroinflammation, dendritic spines, synapsis, T2DM, insulin signaling

INTRODUCTION

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-activated transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily (Auwerx et al., 1999). PPARs are activated by natural ligands derived from dietary lipids, such as polyunsaturated fatty acids and their derivatives and exert an important physiological role in regulating glucose, lipid, and lipoprotein metabolism. Likewise, these receptors can be also activated by synthetic ligands like fibrates, glitazones, or nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (Carvajal et al., 2007; Chek Kun et al., 2017), which make them promising targets for several pathologies. Thus, the interest in the medical field for these drug targets has increased exponentially in the last years.

The PPAR subfamily comprises three isotypes: PPAR α , PPAR γ , and PPAR β/δ . Several studies have shown that PPAR α and PPAR γ activation mediates by promoting the regulation of pathologic processes including neuroinflammation, mitochondrial alterations, and memory impairment (Heneka et al., 2005; Nicolakakis et al., 2008). Interestingly, although PPAR β/δ has been shown to be the most abundant isotype in the central nervous system (CNS) (Moreno et al., 2004), being expressed in the main cellular components of this system including astrocytes, neurons and microglia (Schneeg and Robbins, 2011), its role in neurodegenerative disorders has not been well characterized.

Inflammation not only actively contributes to the development of several neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD) (Calsolaro and Edison, 2016; Regen et al., 2017), but also plays an essential role in the progression of metabolic pathologies, being a key point where both pathologies converge. In fact, there is multiple evidence that insulin resistance is one of the best predictors of memory impairment supporting the hypothesis that AD represents a form of diabetes mellitus that selectively affects the brain, receiving the name of "type 3 diabetes" (Monte and Wands, 2008). Moreover, several studies demonstrated that people suffering from type 2 diabetes mellitus (T2DM) also develop cognitive decline, which is defined as

reduction in one or more cognitive abilities, such as memory (Biessels et al., 2008; Zilliox et al., 2016). In this line, it is well known that obesity actively contributes to the development of T2DM, but also has been related to inflammatory processes and it is considered a clear risk factor in AD (Pugazhenthil et al., 2017; Tumminia et al., 2018; Ebrahimpour et al., 2020). Notably, it has been shown that PPAR β/δ downregulation could be linked to both neuroinflammation and insulin resistance in the brain (De La Monte and Wands, 2006). In fact, several clinical trials have suggested that PPAR β/δ activation reduces inflammation and ameliorates insulin sensitivity (Neels and Grimaldi, 2014; Giordano Attianese and Desvergne, 2015; Vázquez-Carrera, 2016), among others. Therefore, they have been considered as good candidates for the treatment of these pathologies characterized by these hallmarks, such as T2DM (Salvadó et al., 2012). In the CNS, synthetic PPAR β/δ -specific agonists have been reported to ameliorate clinical symptoms, reducing the severity of a variety of CNS pathologies by modulating oxidative stress and inflammatory responses associated with these diseases (Tong and Dominguez, 2016; Tong et al., 2016).

Collectively, although PPAR β/δ seems to play a key role in several pathologic processes, including memory impairment, the mechanisms responsible for these effects remain unknown. Therefore, the aim of the study is to determine the role of PPAR β/δ in the neuropathological pathways involved in the development of memory impairment and as to whether a risk factor involved in cognitive loss and in the development of T2DM such as obesity (high-fat diet, HFD) consumption modulates hippocampal neuropathological markers in mice lacking this nuclear receptor.

MATERIALS AND METHODS

Animals

To perform this study, 6-month-old total knock-out for the PPAR β/δ gene male mice with C57BL/6X129/SV background

(PPAR β / δ ^{-/-}) (Karim et al., 2006) and wild-type (WT) littermates with the same genetic background were used. In all cases, animals were obtained from established breeding couples in the animal facility (Animal facility from the Pharmacy and Food Sciences Faculty from the University of Barcelona; approval number C-0032). After the weaning (at 21 days-old), and throughout their growth, animals were fed either conventional chow (control diet, CT) (ENVIGO, Madison, Wt 53744-4220) or a palmitic acid-enriched diet containing 45% of fat mainly from hydrogenated coconut oil (HFD) (Research Diets Inc., NB, United States). Thus, four groups were defined: WT CT, WT HFD, PPAR β / δ ^{-/-} CT, and PPAR β / δ ^{-/-} HFD.

All animals were kept under stable conditions of humidity and temperature, standard light-dark cycle (12-h light/dark cycle) and food and water *ad libitum*, following the ethics guidelines defined by the European Committee (European Communities Council Directive 2010/63/EU). Manipulation protocols were previously approved by the ethics committee from the University of Barcelona and, at all times, it was made sure that animal numbers, their stress, and pain were kept under a necessary minimum following the appropriate animal manipulation ethical methodologies.

Glucose and Insulin Tolerance Tests

For both tests, mice were fasted for 6 h and the tests were performed in a quiet room, preheated to +28°C. In the glucose tolerance test (GTT), glucose was administered at a dose of 1 g/kg intraperitoneally (i.p.). On the other hand, in the insulin tolerance test (ITT), the dosage of insulin used was 0.75 IU/Kg and it was also administered i.p. Next, samples from the tail vein were extracted in consecutive periods of time and glucose levels were measured using an Accu-check® Aviva glucometer. In GTT, measurements were made at 5, 15, 30, 60, and 120 min after the administration of glucose. In the ITT case, samples were extracted at 15, 30, 45, 60, and 90 min after the insulin administration.

The animals were monitored in every moment, and in those cases where glucose levels dropped under a concentration of 20 mg/dl, a dosage of 1 g/Kg of glucose was administered i.p. and they were kept in observation until blood glucose concentrations were stable and the animal behavior was normal. Twelve animals per group were analyzed.

Novel Object Recognition Test

This behavioral test is used for testing the hippocampal-dependent recognition memory of mice based on the spontaneous tendency of rodents to spend more time exploring a novel object than a familiar one. It consists of three phases: habituation, familiarization, and test phase. In the first one, mice were placed in a circular open-field arena of 40 cm in diameter surrounded by black curtains where the light intensity in the middle of the field was 30 lux. Their tracking was monitored (Smart 3.0; Panlab) for three consecutive days for 10 min each mouse. In the fourth day, two identical objects (A-A) were placed in the arena at an equal distance and 24 h later, one object was replaced by a new one (A-B) and the exploration time (10 min) of each mouse was measured.

Exploration was defined as the orientation of snout of the animals toward the object, sniffing or touching (Antunes and Biala, 2012; Ettcheto et al., 2016). In those cases, when the total time exploring both objects was less than 5 min, the mouse was excluded. Data were measured by discrimination index (DI), which indicates the difference in exploration time in seconds between familiar and novel object, using the following equation:

$$DI = \frac{B \text{ exploration time} - A \text{ exploration time}}{\text{Total exploration time}}$$

All spaces were properly cleaned with 96% ethanol between animals, in order to eliminate odor or other cues.

Hippocampal Spine Density Analysis

To carry out the spine density analysis, five animals per group were used which were sacrificed by cervical dislocation. After, the brain was isolated, it was processed following the instructions of the GolgiStain™ Kit purchased from FD Neurotechnologies, Inc. (FD Rapid GolgiStain™ Kit; Cat #PK401). Images were obtained with a BX61 Laboratory Microscope (Melville NY-Olympus America Inc.). The quantification was carried out by selecting five neurons per animal in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus. Measurement was done at least 50 μ m from the soma along consecutive 10 μ m on secondary branches starting 10 μ m after branching from the primary dendrite. Spine density was calculated by dividing the number of spines per segment by the length of the segment and was expressed as the number of spines per 10 μ m of dendrite.

Immunoblot Blot Analysis

Fresh brains of at least four mice per group were extracted right after euthanasia (cervical dislocation) and the hippocampus were dissected and kept frozen at -80°C until use. Next, samples were homogenized in lysis buffer (Tris HCl 1 M pH 7.4, NaCl 5 M, EDTA 0.5 M pH 8, Triton, distilled H₂O) containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Complete Mini, EDTA-free; Protease Inhibitor cocktail tablets, 11836170001, Roche Diagnostics GmbH, Germany; Phosphatase Inhibitor Cocktail 3, P0044, Sigma-Aldrich, United States). The samples were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at 4°C after a 30-min incubation at the same temperature. The supernatant was recovered and frozen at -80°C until use.

Sample protein concentration was determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™). For immunoblot assays, 10 μ g per sample was used and denatured at 95°C for 5-min in a sample buffer [0.5 M Tris HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue]. Electrophoresis was performed on acrylamide gels of 7%, 10%, and 12% concentration at constant 120 V and transferred to polyvinylidene difluoride sheets (Immobilon®-P Transfer Membrane; IPVH00010; Merk Millipore Ltd., United States) at constant 200 mA for 120 min. Then, membranes were blocked for 1-h with 5% non-fat milk dissolved in TBS-T buffer [0.5 mM Tris; NaCl, Tween® 20 (P1379, Sigma-Aldrich, United States), pH 7.5], washed with TBS-T 3 times for 5-min, and incubated with the appropriate primary antibody, detailed in **Supplementary Table S1**,

overnight (O/N) at 4°C. Subsequently, blots were washed in TBST buffer and incubated at room temperature for 1 h with the appropriate secondary antibody (Supplementary Table S1). Finally, results were obtained through chemiluminescence detection using the Pierce® ECL Western Blotting Substrate (32106, Thermo Scientific, United States), a Bio-Rad Universal Hood II Molecular Imager, and the Image Lab v5.2.1 software (Bio-Rad laboratories). Measurements were expressed in arbitrary units and all results were normalized with the corresponding loading control (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH).

Immunofluorescence

At least four animals per group were previously anesthetized by the i.p. injection of ketamine (100 mg/Kg) and xylazine (10 mg/Kg). When they were in the no-pain sleep phase, they were intracardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB). After perfusion, brains were removed and stored in 4% PFA O/N at 4°C. The next day, the solution was changed into 4% PFA+30% sucrose. Coronal sections of 20 μ m were obtained by a cryostat (Leica Microsystems) and kept in a cryoprotectant solution at -20°C until their use.

On the first day of the assay, free-floating sections were washed three times with 0.1 M PBS pH 7.35 and after, five times with PBS-T (0.1 M PBS; 0.2% Triton X-100). Then, they were blocked in a solution containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% Triton X-100 diluted with PBS-T five times for 5 min each and incubated with the primary antibody (Supplementary Table S2) O/N. On the second day, slices were washed with PBS-T 5 times for 5 min and incubated with the pertinent secondary antibody (Supplementary Table S2) for 2 h at room temperature. Finally, sections were treated with 0.1 μ g/ml Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, United States), used for cell nuclei staining, for 8 min in the dark at room temperature and washed with 0.1 M PBS. All reagents, containers and materials exposed to Hoechst were properly managed and processed to avoid any cytotoxic contamination. Finally, brain slices were mounted in gelatin-coated slides using Fluoromount G (EMS) and were left to dry O/N. Image acquisition of dentate gyrus of hippocampus was obtained in a blinded manner using an epifluorescence microscope (BX61 Laboratory Microscope, Melville, NY-Olympus America Inc.) and quantified by ImageJ.

Statistical Analysis

All results are presented as MEAN \pm SD. Groups were compared against each other using two-way ANOVA. When variables independently were significant, we denoted * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, and **** p < 0.0001 for the diet factor and $^{\$}$ p < 0.05, $^{\$\$}$ p < 0.01, $^{\$ \$ \$}$ p < 0.001, and $^{\$ \$ \$ \$}$ p < 0.0001 for the genotype factor. When the interaction between two analyzed factors in ANOVA was significant, Tukey's post hoc test was performed for comparison among groups (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, and **** p < 0.0001). All analyses and GAPDH representations were obtained using Graph Pad Prism software for Mac version 6.01; Graph Pad Software, Inc.

RESULTS

HFD Feeding Induces Body Weight Increase and Glucose Alterations at Peripheral Level

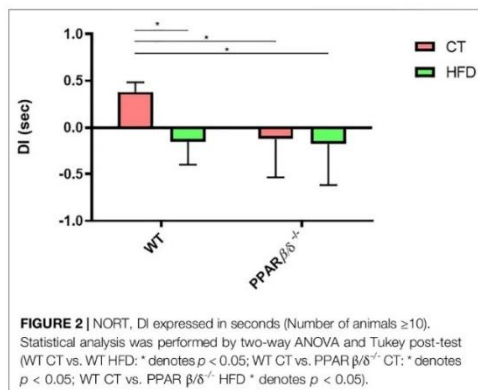
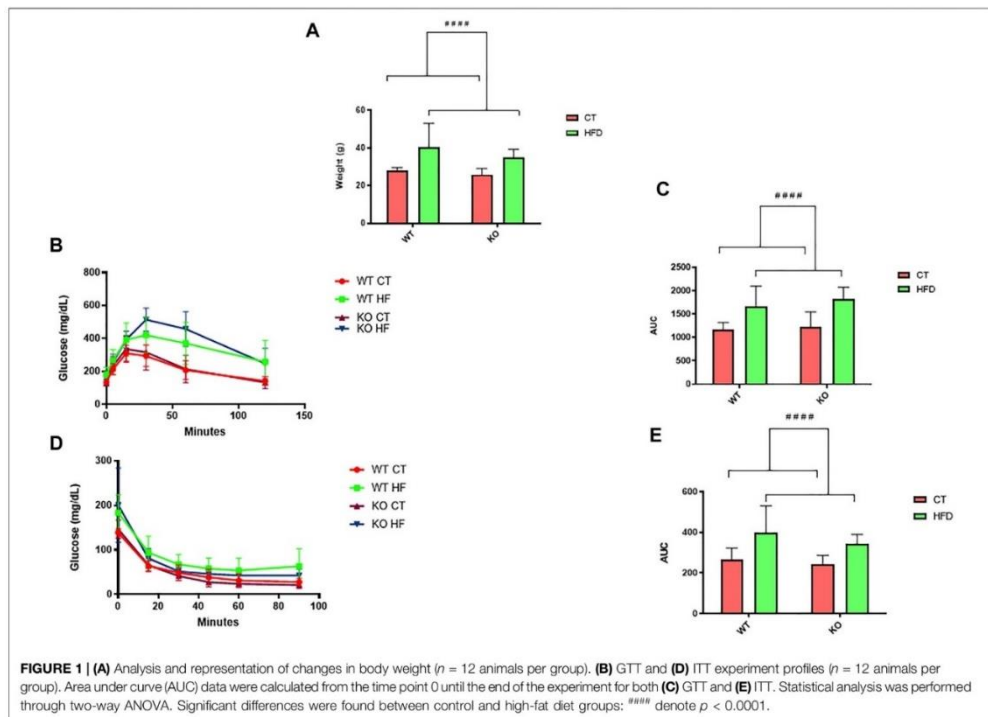
Body weight profile was analyzed at 6 months of age in WT and PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ mice after being fed conventional chow or HFD from their weaning. Two-way ANOVA revealed that feeding HFD significantly increased (p < 0.0001) their body weight in both genotypes compared to mice fed the control diet (Figure 1A), reaching an increase of 135% in body weight in HFD vs. CT. Moreover, GTT and ITT were performed in order to evaluate peripheral alterations of glucose metabolism in these experimental groups. In line with our previous studies, two-way ANOVA showed a significant effect of diet variable in both GTT (p < 0.0001) and ITT (p < 0.0001), with an increase of 145% due to HFD feeding in both tests, thereby indicating that feeding the HFD affects both genotypes (Figures 1B–E).

Evaluation of Memory Impairment

To determine the impact of PPAR β/δ deficiency on memory function together with HFD intake, we evaluated the hippocampal-dependent recognition memory by Novel Object Recognition Test (NORT) (Figure 2). Two-way ANOVA revealed a significant effect of diet and genotype (p < 0.05 and p < 0.05, respectively) with interaction of both variables (p < 0.05). Therefore, Tukey's post hoc was performed which showed that HFD feeding promoted a significant reduction of 39% in the memory capacity in WT animals. However, PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ mice demonstrated to have a significant decrease in recognition memory compared to WT CT independently of the diet (WT CT vs. WT HFD p < 0.05; WT CT vs. PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ CT p < 0.05; WT CT vs. PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ HFD p < 0.05).

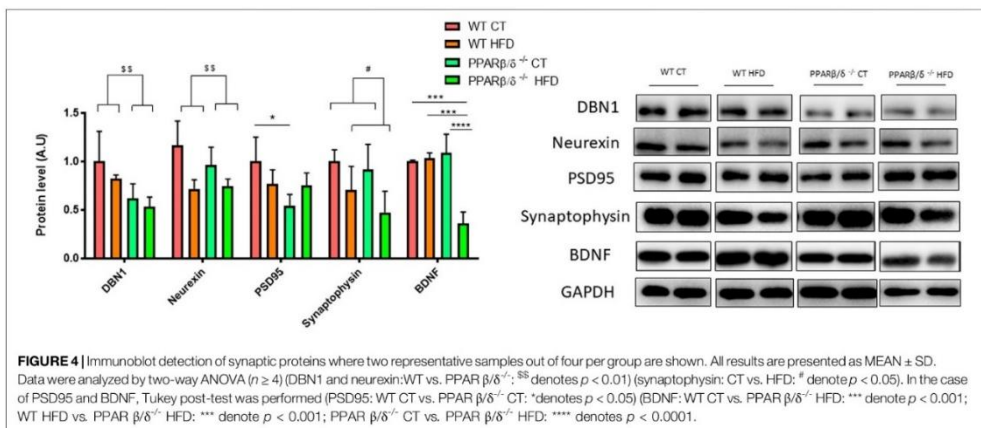
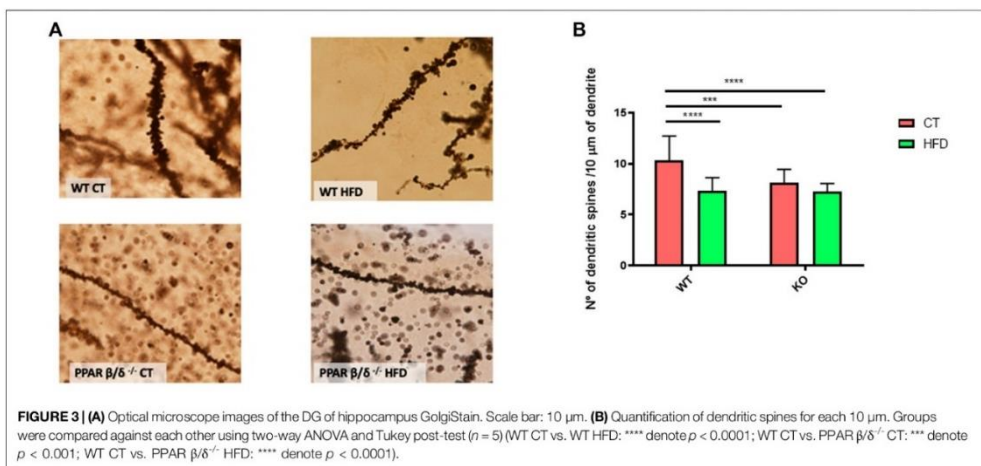
PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ Mice and Obesity Are Associated With Decreased Dendritic Spine Density

The memory process was also evaluated by the analysis of dendritic spine density in the hippocampus, since it has been demonstrated that the number of dendritic spines positively correlates with synaptic plasticity and cognition (Yuste and Bonhoeffer, 2001; Sala and Menahem, 2014). In our study, the dendritic spine detection and subsequent quantification were performed where the obtained results correlated with those of the behavioral test. Specifically, our data demonstrated a significant effect of diet and genotype (p < 0.01 and p < 0.0001, respectively) with the interaction between both variables (p < 0.01). Following, Tukey's post hoc was performed and our results showed a significant decrease of 30% in hippocampal spine number in WT mice after being fed with HFD (p < 0.0001). By contrast, animals with PPAR β/δ deficiency also exhibited a significant reduction compared to WT, but HFD feeding did not induce a synergic effect (WT CT vs. PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ CT 22%, p < 0.001; WT CT vs. PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ HFD 30%; p < 0.0001) (Figures 3A,B). Moreover, as can be observed in Figure 3A, the reduction in spine number was accompanied by shorter and smaller dendritic spines (qualitative evaluation).



Therefore, our results indicated that HFD feeding induces memory alterations in WT. However, when animals exhibit PPAR β/δ deficiency memory profile was similar, but it was not enhanced by the diet.

In order to support these findings, proteins directly involved in memory process and plasticity in the hippocampus such as the drebrin 1 (DBN1), neuexin, density protein 95 (PSD95), synaptophysin, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were evaluated. DBN1 has been demonstrated to play a key role in dendritic spine regulation (Ivanov et al., 2009a; Ivanov et al., 2009b). In this line, two-way ANOVA revealed a significant reduction ($p < 0.01$) in DBN1 protein levels in PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ mice compared with WT mice. Likewise, neuexin (a presynaptic protein) showed the same pattern, a significant implication of the genotype ($p < 0.01$) in its protein level. Moreover, a significant effect of the genotype ($p < 0.05$) also was observed in PSD95, (a postsynaptic protein) but in this case, with interaction between two variables ($p < 0.05$). Therefore, Tukey's post hoc was carried out to analyze the differences among the experimental groups. Our results exhibited a significant reduction in PSD95 in PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ CT compared to WT CT. Regarding synaptophysin, this protein is expressed in synaptic vesicles and its reduction has been associated with impairments to neuronal health together with BDNF (J. T. Yang et al., 2019). In this line, our results showed a significant reduction of synaptophysin in those animals fed HFD, demonstrating a significant effect of this variable ($p < 0.05$), but this reduction

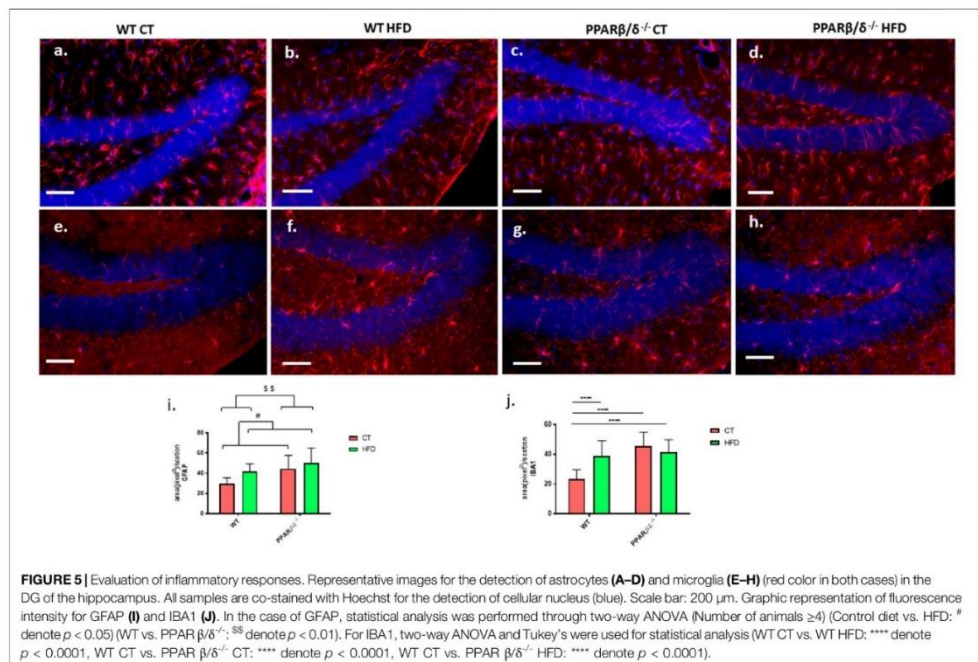


was not exacerbated by the absence of PPAR β/δ . Finally, concerning BDNF, results showed a significant effect of the diet ($p < 0.001$) and genotype ($p < 0.01$) with the interactions between both variables ($p < 0.001$). Next, Tukey's post hoc test revealed a significant decrease in hippocampal BDNF protein levels in PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ mice fed HFD compared to the other groups (WT CT vs. PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ HFD $p < 0.001$; WT HFD vs. PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ HFD $p < 0.001$; PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ CT vs. PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ HFD $p < 0.0001$) (Figure 4). Collectively, as previously described (Saiyasit et al., 2020), our results confirm that HFD feeding contributes to disturbances in the synaptic transmission. However, when there is a PPAR β/δ deficiency, biomarkers related to neuronal

function are directly altered independently of diet, suggesting the essential role that PPAR β/δ plays in the synaptic transmission.

PPAR β/δ Deficiency Increases Glial Markers Activation

Evaluation of the reactive profile of astrocytes and microglia in the hippocampal dentate gyrus was performed through the detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) proteins by immunohistochemistry. Representative images of all four experimental groups can be found in Figure 5. Moreover,



graphic quantification of fluorescence intensity measured by ImageJ is shown in Figure 5I for GFAP and j for IBA1. In the case of GFAP, two-way ANOVA showed a significant effect of diet ($p < 0.05$) and genotype variables ($p < 0.01$) without interaction between them, demonstrating that, on the one hand, HFD induced a significant activation of astrocytes compared to control diet, and on the other, PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ mice presented a significantly higher basal profile of reactive astrocytes than WT mice (Figure 5I). In the study of microgliosis, our results revealed a significant effect of both diet ($p < 0.01$) and genotype ($p < 0.0001$) with an interaction between both factors ($p < 0.0001$). Subsequently, Tukey's post hoc showed a significant microgliosis in WT mice fed HFD compared to those fed conventional chow ($p < 0.0001$). In the case of PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ mice, both groups exhibit a significant microglial activation compared to WT regardless of the consumed diet (PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ CT vs. WT CT $p < 0.0001$; PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ HFD vs. WT CT) (Figure 5J).

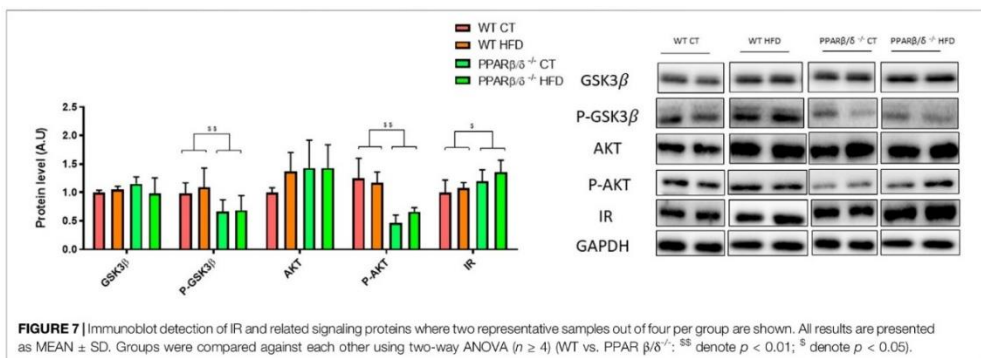
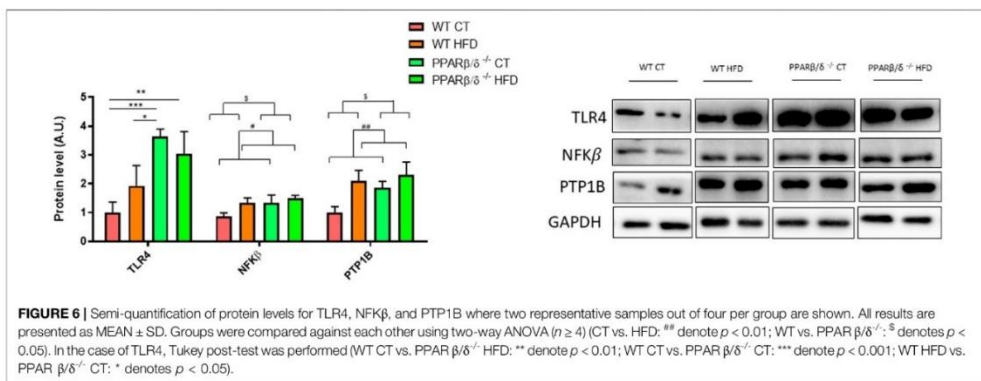
At the molecular level, the levels of different proteins related to the neuroinflammation process were analyzed in the hippocampus including toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor kappa B (NF κ B), and protein tyrosine phosphatase (PTP1B). Regarding TLR4 protein levels, two-way ANOVA showed a significant effect of genotype ($p < 0.05$) with the

interaction between both variables, genotype and diet ($p < 0.05$). Next, Tukey's post hoc revealed a significant TLR4 increase in PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ mice compared to WT fed the standard chow diet (WT CT vs. PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ CT $p < 0.001$; WT CT vs. PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ HFD $p < 0.01$; WT HFD vs. PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ CT $p < 0.05$) (Figure 6).

In the case of NF κ B and PTP1B, two-way ANOVA revealed a significant effect of diet and genotype for both proteins ($p < 0.05$ and $p < 0.05$; $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively), although none of them demonstrated interaction between both factors (Figure 6). Collectively, our results confirm that feeding the HFD and the lack of PPAR β/δ differently affect the levels of proteins involved in neuroinflammation.

PPAR β/δ Deficiency Disrupts the Insulin Signaling Pathway in the Hippocampus

Since previous studies have demonstrated that hippocampal insulin signaling plays a key role in the memory processes (McNay and Recknagel, 2011; Talbot et al., 2012; Barber et al., 2021), we next evaluated different proteins involved in this molecular pathway, including glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) and protein kinase B (AKT). The phosphorylation levels of these proteins showed a similar profile. When two-way



ANOVA was applied, a significant effect of the genotype was observed ($p < 0.01$ and $p < 0.01$) without interaction between genotype and diet, thereby suggesting that PPAR β/δ deficiency reduces their activation. However, GSK3 β and AKT did not show a significant effect on variables after statistical analysis. Surprisingly, when insulin receptor (IR) was evaluated, results showed that the genotype significantly affected IR levels ($p < 0.05$), probably to compensate for the inefficacy of the pathway (Figure 7).

DISCUSSION

The present work provides novel findings on the neurological role of PPAR β/δ in mice under standard conventional chow diet and after HFD intake, which indicate that PPAR β/δ plays a prominent role in dendritic spine preservation and memory process; therefore, it may protect against the memory impairment. Interestingly, HFD consumption does not exacerbate brain

cognitive pathology observed in the PPAR β/δ -deficient mice at this level. These results are in agreement with those observed in central insulin signaling and neuroinflammation markers, reinforcing the importance of this receptor at central level. On the other hand, our data demonstrated that alterations in body weight, GTT, and ITT were induced due to continuous HFD intake and not due to the lack of this nuclear receptor, probably due to continued dietary intervention. Thus, using the well-established line of PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ mice and its WT controls, we assessed the impact of PPAR β/δ deficiency on cognitive function, synaptic plasticity, dendritic spine density, and synaptic markers, and evaluated whether HFD intake deteriorates this pathological status.

It has been widely demonstrated that the PPAR superfamily plays a key role in metabolic processes. In fact, their agonists are used for the treatment of pathologies including T2DM. Specifically, it has been demonstrated that PPAR β/δ is expressed throughout the brain, with prominent localization in the mouse hippocampus, entorhinal cortex, and hypothalamus

(Braissant et al., 1996; Heneka and Landreth, 2007; Hall et al., 2008). Interestingly, several studies have demonstrated the link between metabolic dysfunctions and memory impairment. In fact, AD is considered as type 3 diabetes (Small et al., 2000; Leszek et al., 2017). Therefore, taking all these into account, the interest in this receptor and its agonists has increased for potential therapeutic interventions in the treatment of AD and cognitive disorders related to obesity.

Regarding metabolic alterations, PPAR β/δ agonists substantially decrease adiposity and improve glucose intolerance and insulin resistance in animal models (Barak et al., 2002; Nicolakakis et al., 2008; Salvadó et al., 2012; Tan et al., 2016; Palomer et al., 2018). However, it has been observed that PPAR β/δ -null mice showed a significant body weight reduction compared to control mice in the first week after birth, differences that disappear when they are adults (Peters et al., 2000). These data agree with the results presented in this study in which we did not observe changes in weight depending on the genotype.

On the other hand, it is well known that feeding the HFD causes a significant increase in body weight, glucose intolerance, and insulin resistance, (Musso et al., 2003; Álvarez-Amor et al., 2021). However, we did not find alterations in these parameters due to the genotype. One possible explanation for these discrepancies could be the differences in time exposition to the HFD. In this context, previous studies have exposed animals to a hypercaloric diet following a different pattern compared to ours in which animals were fed from their weaning at 21 days old until their sacrifice at 6 months. Therefore, in line with previous studies, young animals exposed to a HFD might show more plasticity to adapt to the diet (Burke et al., 2021) and for this reason, our mice did not show differences due to lack of the receptor.

It is well known that dendritic spines play a pivotal role in the learning process, whereas synaptic plasticity alterations have been directly correlated to memory impairments (Terry et al., 1991; Scheff et al., 2006; Bourne and Harris, 2007; Knott and Holtmaat, 2008; Chidambaram et al., 2019; Etcheto et al., 2020). This prompted us to focus our study on the evaluation of these structures in order to assess the effect of PPAR β/δ deficiency in dendritic spines density at the hippocampal level, since PPAR β/δ has been associated with the neuroinflammatory process and insulin resistance in the brain, which are considered important contributors to neurodegeneration. In this line, our results highlighted that PPAR β/δ ^{-/-} mice showed a significant reduction of these structures in mice fed a standard diet and this was not exacerbated by the HFD, suggesting that this receptor is necessary for the maintenance of dendritic spines and, in consequence, for eluding memory impairment. By contrast, in WT mice, we observed a reduction of dendritic spines due to HFD intake for a long period of time. These results agreed with previous studies that demonstrated that HFD-induced obesity is considered a clear risk factor for the development of AD. These data were correlated with those obtained in the NORT, also in previous studies performed by our group (Barroso et al., 2013). Moreover, it has been widely demonstrated that PPAR β/δ plays a key role in running endurance (Wang et al., 2004; Schuler et al.,

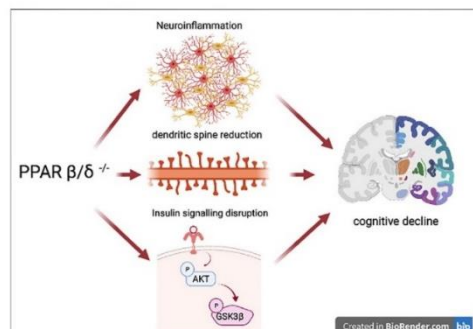


FIGURE 8 | Schematic representation of the effects of PPAR β/δ deficiency. The figure shows how this receptor is a key molecule in the development of some of the most important features of memory impairment such as neuroinflammation, reduction in the number of dendritic spines, as well as an alteration of synaptic biomarkers, and insulin signaling disruption. In this way, this transcription factor represents a promising target for the treatment and improvement of memory impairment, an important hallmark of neurodegenerative diseases.

2006; Röckl et al., 2007; Thomson et al., 2007). PPAR β/δ is the most expressed isoform in the skeletal muscle, especially in the oxidative fibers. These fibers mainly expressed enzymes involved in the fatty acids oxidation. In this line, it has been demonstrated that the overexpression of PPAR β/δ in this tissue induces the reorganization of these fibers increasing the percentage of oxidative fibers and decreasing muscle fatigue (Hämäläinen and Pette, 1995), being crucial also for endurance (Wang et al., 2004). Therefore, the lack of this isotype has been associated with alterations in physical performance that imply an intense exercise including swimming or running. Therefore, the lack of PPAR β/δ may affect the swimming performance, making MWM unreliable to assess the mice cognition.

On the other hand, it is known that obesity-associated with HFD intake heightens alterations in dendritic spine density, neuronal loss, and memory impairment through several mechanisms, including neuroinflammation (Stranahan et al., 2011; Duffy et al., 2019). Our results confirm this dendritic spine reduction in WT fed HFD compared to WT mice fed the standard chow.

Going in depth at the molecular level, DBN1 is an actin-binding protein abundant within dendritic spines, which is typically located in postsynaptic receptive regions of excitatory synapses (Sekino et al., 2007) and it is thought that it controls spine morphology and function (Hayashi et al., 1996). In fact, its reduction in the hippocampus has been correlated with cognitive deficits and, by contrast, its preservation has been associated with neuroprotection (Harigaya et al., 1996; Hatanpää et al., 1999; Kojima and Shirao, 2007; Counts et al., 2012). In line with these previous studies, our study showed a significant decrease in DBN1 protein level in the hippocampus induced by PPAR β/δ deficiency. This is in agreement with the findings obtained in

dendritic spine analysis. Likewise, it has been reported that *dbn1* loss in the brain is not sufficient to induce synaptic dysfunction (Willmes et al., 2017). Therefore, our study suggests that PPAR β/δ actively contributes to the preservation of these structures together with DBN1. Consistent with this, neurexin and PSD95 protein levels also showed a similar pattern, which confirms that PPAR β/δ plays a pivotal role in synaptic plasticity.

Regarding synaptophysin, the reduction of this glycoprotein, which predominates in the synaptic vesicles, has been related to memory impairment (Zhang et al., 2019; Du et al., 2020). In this context, as it has been previously commented, obesity also plays a key role in the correct function of memory interconnecting these three concepts (Daniels et al., 2005; Kalarchian and Marcus, 2012). Our results showed a significant decrease in synaptophysin protein levels in the hippocampus induced by the HFD feeding. However, we did not observe any significant reduction related to the genotype. The neuronal activity has also been described to regulate BDNF transport into dendrites, which have been involved in the modulation of synaptic transmission and synaptogenesis (Lu and Figurov, 1997; Tongiorgi et al., 1997; Tongiorgi, 2008). In this study, we observed a significant reduction in its levels in PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ fed HFD compared to the other groups, suggesting that PPAR β/δ deficiency alone is not enough to alter BDNF protein levels at this time.

Neuroinflammation is a common feature of every central nervous system diseases and is being highly recognized as a potential mediator of memory impairment (Fourrier et al., 2019; McGrattan et al., 2019). The impact of this complex process, which includes the alteration of the TLR4 pathway and glial activation among other processes, induces the release of pro-inflammatory cytokines and aberrant neuronal circuits, contributing altogether to the acceleration of cognitive decline (Zhang et al., 2018a; Jin et al., 2019; Malpetti et al., 2020). However, the involvement of inflammation is not fenced only in the brain. In fact, it has been demonstrated that HFD intake and obesity also impair cognitive function in animal models (Kanoski and Davidson, 2011), as well as in humans (Power et al., 2015), by disrupting hippocampal morphology and synaptic plasticity caused by inflammation (Porter et al., 2010; Wang et al., 2015). In this context, PPAR β/δ has been involved in the modulation of inflammation at both peripheral and central levels. Our study demonstrated that the lack of PPAR β/δ receptor enhances the gliosis in the hippocampus, contributing to astrocyte and microglial activation. Likewise, TLR4 and NFK β protein levels also showed a significant increase in PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ mice. In agreement with these data, studies performed by Rodríguez-Calvo and colleagues demonstrated that the PPAR β/δ agonist GW501516 inhibited LPS-induced cytokine production by preventing NFK β activation (Rodríguez-Calvo et al., 2008). Interestingly, HFD promoted similar alterations to those observed when there is a deficiency of PPAR β/δ . Exceptionally, in the case of microglial activation, whereas feeding HFD induced neuroinflammation in WT mice, feeding KO mice HFD did not exacerbate these changes, similar to TLR4, probably due to the inflammation observed in PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ mice that reached so high levels that it can be increased by chronic low-intensity intervention such as diet.

Interestingly, our results showed a significant increase in PTP1B protein levels in the hippocampus caused by the genotype. This increase was similar to that observed after HFD intake. An analogous trend was observed for NFK β and astrogliosis. The PTP1B expression is highly increased in activated microglia, which in turn is enhanced due to pro-inflammatory processes, suggesting that it is an important positive regulator of inflammation (Song et al., 2016). However, PTP1B has not only been related to neuroinflammatory mechanisms. In fact, it has been demonstrated that it is a key regulator of insulin sensitivity since mice with *Ptp1b* gene deletion present a reduction of insulin resistance, turning it into a promising target not only for the design of anti-diabetic drugs (Elchebly et al., 1999; Zhang and Lee, 2003) but also to elude synaptic alteration and cognitive loss (Fuentes et al., 2012; Ricke et al., 2020), since PTP1B activity in the hippocampus has been correlated with impaired neuronal insulin signaling (Wang et al., 2017). Taking all these data into account, our results confirm the studies performed by de la Monte and colleagues that demonstrated that downregulation of PPAR β/δ could be linked to both inflammation and insulin resistance in the brain (De La Monte and Wands, 2006).

It is well known that IR and insulin signaling play an important role in neuronal physiological functions, contributing to synapse formation, neuronal plasticity (Kleinriders et al., 2014; Agostinone et al., 2018), and reduction in neuroinflammatory process, which all together promote the cognitive function (Chiu et al., 2008; Craft et al., 2012; Carlson et al., 2014). Once IR is activated, AKT is phosphorylated/activated, which in turn phosphorylates various biological substrates, including GSK3 β . In this context, the dysfunction of this pathway occurs, which has been associated with insulin resistance leading to memory impairment (Qi et al., 2015; Zhang et al., 2018b; Yang et al., 2020). In our study, p-AKT and p-GSK3 β protein levels showed a significant decrease in the hippocampus of PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ mice in agreement with spine dendritic reduction and increased neuroinflammation observed in this genotype. Moreover, we did not observe changes in the diet variable, probably due to the fact that the lack of this receptor interferes in the attachment of fat to its receptor. Of note, an increase in IR protein level was observed in these mice, suggesting that it could be a compensatory mechanism to deal with this insulin signaling disruption. These results concur with previous studies performed by Buck and colleagues who demonstrated that when insulin-like growth factor 1 receptor (a co-receptor of insulin signaling pathway) was inhibited, a compensatory IR activation was observed (Buck et al., 2010), demonstrating the key role of PPAR β/δ in this process.

CONCLUSION

In conclusion, the present study demonstrates for the first time that PPAR β/δ deficiency in the brain constitutes not only a new risk factor associated with cognitive loss in neurological diseases but also a key molecule targeting the pivotal pathways leading to memory impairment which include neuroinflammation, insulin

resistance, dendritic spine regulation, and synaptic plasticity, among others (Figure 8). On the other hand, we observed that HFD intake affects mechanisms involved in the memory process in the presence of the receptor, but did not exacerbate this process in the presence of PPAR β/δ . Therefore, PPAR β/δ provides a new and promising therapeutic target in order to design novel strategies focused on curbing or improving memory impairment present in most neurological diseases.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by University of Barcelona (<http://www.ub.edu/ceea/?msclid=822088fea9ee11ec879d7860fec6f4a1>).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TE-J performed experiments, collected, and analyzed the data, edited figures, performed bibliography search, and wrote the original draft section. OB performed experiments, bibliography search, writing original draft section. AmC performed manuscript revision, experiment supervision, bibliography search. ES-L did manuscript revision, experiment supervision,

EV manuscript revision, and experiment supervision. AP contributed to dendrites quantification and manuscript revision. JO performed manuscript revision and linguistic correction. CA performed manuscript revision and experiment supervision. JF performed manuscript revision. WW performed manuscript revision, linguistic correction, and bibliography search. MV-C handled manuscript revision, linguistic correction, and bibliography search. AnC handled proposal and schematization of the article, funding acquisition, manuscript revision, and bibliography search. ME handled schematization of the article, writing original draft, bibliography search. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation SAF 2017-84283-R, CB06/05/0024 (CIBERNED), CB07/08/0003 (CIBERDEM) and Sant Joan de Deu Research Institute (CERCA) Program/Generalitat de Catalunya and partly supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (RTI 2018-093999-B-I00) and European Union ERDF funds.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.902047/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Agostinone, J., Alarcón-Martínez, L., Gamlin, C., Yu, W. Q., Wong, R. O. L., and Di Polo, A. (2018). Insulin Signalling Promotes Dendrite and Synapse Regeneration and Restores Circuit Function after Axonal Injury. *Brain* 141, 1963–1980. doi:10.1093/brain/awy142
- Álvarez-Amor, L., Sierra, A. L., Cárdenas, A., López-Bermudo, L., López-Beas, J., Andújar, E., et al. (2021). Extra Virgin Olive Oil Improved Body Weight and Insulin Sensitivity in High Fat Diet-Induced Obese LDLr^{-/-}. Leiden Mice without Attenuation of Steatohepatitis. *Sci. Rep.* 11, 8250.
- Antunes, M., and Biala, G. (2012). The Novel Object Recognition Memory: Neurobiology, Test Procedure, and its Modifications. *Cogn. Process* 13, 93–110. doi:10.1007/S10339-011-0430-Z
- Auwerx, J., Baulieu, E., Beato, M., Becker-Andre, M., Burbach, P. H., Camerino, G., et al. (1999). A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* 97, 161–163. doi:10.1016/S0092-8674(00)80726-6
- Barak, Y., Liao, D., He, W., Ong, E. S., Nelson, M. C., Olefsky, J. M., et al. (2002). Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta on Placental, Adiposity, and Colorectal Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 303–308. doi:10.1073/pnas.012610299
- Barber, T. M., Kyrou, I., Randeva, H. S., and Weickert, M. O. (2021). Mechanisms of Insulin Resistance at the Crossroad of Obesity with Associated Metabolic Abnormalities and Cognitive Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–16. doi:10.3390/ijms22020546
- Barroso, E., del Valle, J., Porquet, D., Vieira Santos, A. M., Salvadó, L., Rodríguez-Rodríguez, R., et al. (2013). Tau Hyperphosphorylation and Increased BACE1 and RAGE Levels in the Cortex of PPAR β/δ -Null Mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 1241–1248. doi:10.1016/j.bbdis.2013.03.006
- Biessels, G. J., Deary, I. J., and Ryan, C. M. (2008). Cognition and Diabetes: a Lifespan Perspective. *Lancet Neurol.* 7, 184–190. doi:10.1016/S1474-4422(08)70021-8
- Bourne, J., and Harris, K. M. (2007). Do thin Spines Learn to Be Mushroom Spines that Remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 381–386. doi:10.1016/j.conb.2007.04.009
- Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M., and Wahli, W. (1996). Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): Tissue Distribution of PPAR-Alpha, -beta, and -gamma in the Adult Rat. *Endocrinology* 137, 354–366. doi:10.1210/endo.137.1.8536636
- Buck, E., Gokhale, P. C., Koujak, S., Brown, E., Eyzaguirre, A., Tao, N., et al. (2010). Compensatory Insulin Receptor (IR) Activation on Inhibition of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R): Rationale for Cotargeting IGF-1R and IR in Cancer. *Mol. Cancer Ther.* 9, 2652–2664. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0318
- Burke, L. M., Whitfield, J., Heikura, I. A., Ross, M. L. R., Tee, N., Forbes, S. F., et al. (2021). Adaptation to a Low Carbohydrate High Fat Diet Is Rapid but Impairs Endurance Exercise Metabolism and Performance Despite Enhanced Glycogen Availability. *J. Physiol.* 599, 771–790. doi:10.1113/JP280221
- Calsolaro, V., and Edison, P. (2016). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Current Evidence and Future directions. *Alzheimers Dement.* 12, 719–732. doi:10.1016/j.jalz.2016.02.010
- Carlson, S. W., Madathil, S. K., Sama, D. M., Gao, X., Chen, J., and Saatman, K. E. (2014). Conditional Overexpression of Insulin-like Growth Factor-1 Enhances Hippocampal Neurogenesis and Restores Immature Neuron Dendritic

- Processes after Traumatic Brain Injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73, 734–746. doi:10.1097/NEN.0000000000000092
- Carvajal, K., De La Luz Hernández-Esquivel, M., and Moreno-Sánchez, R. (2007). PPARs, Síndrome Metabólico Y Enfermedad Cardíaca. *Arch. Cardiol. Mex. Suppl.* 4, 66–76.
- Chek Kun, T., Zhuang, Y., and Wahli, W. (2017). Synthetic and Natural Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Agonists as Candidates for the Therapy of the Metabolic Syndrome. *Expert Opin. Ther. targets* 21, 333. doi:10.1080/14728222.2017.1280467
- Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., et al. (2019). Dendritic Spines: Revisiting the Physiological Role. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 92, 161–193. doi:10.1016/j.pnpb.2019.01.005
- Chiu, S. L., Chen, C. M., and Cline, H. T. (2008). Insulin Receptor Signaling Regulates Synapse Number, Dendritic Plasticity, and Circuit Function *In Vivo*. *Neuron* 58, 708–719. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.014
- Counts, S. E., He, B., Nadeem, M., Wu, J., Scheff, S. W., and Mufson, E. J. (2012). Hippocampal Drebrin Loss in Mild Cognitive Impairment. *Neurodegener. Dis.* 10, 216–219. doi:10.1159/00033122
- Craft, S., Baker, L. D., Montine, T. J., Minoshima, S., Watson, G. S., Claxton, A., et al. (2012). Intranasal Insulin Therapy for Alzheimer Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment: A Pilot Clinical Trial. *Arch. Neurol.* 69, 29–38. doi:10.1001/archneurol.2011.233
- Daniels, S. R., Arnett, D. K., Eckel, R. H., Gidding, S. S., Hayman, L. L., Kumanyika, S., et al. (2005). Overweight in Children and Adolescents: Pathophysiology, Consequences, Prevention, and Treatment. *Circulation* 111, 1999–2012. doi:10.1161/01.CIR.0000161369.71722.10
- de la Monte, S. M., and Wands, J. R. (2008). Alzheimer's Disease Is Type 3 Diabetes-Evidence Reviewed. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2, 1101–1113. doi:10.1177/193229680800200619
- De La Monte, S. M., and Wands, J. R. (2006). Molecular Indices of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Occur Early and Often Progress with Severity of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 9, 167–181. doi:10.3233/jad-2006-9209
- Du, H., Chen, X., Zhang, L., Liu, Y., Zhan, C., Chen, J., et al. (2020). Experimental Autoimmune Prostatitis Induces Learning-Memory Impairment and Structural Neuroplastic Changes in Mice. *Cell. Mol. Neurobiol.* 40 (1), 99–111. doi:10.1007/s10571-019-00723-2
- Duffy, C. M., Hofmeister, J. J., Nixon, J. P., and Butterick, T. A. (2019). High Fat Diet Increases Cognitive Decline and Neuroinflammation in a Model of Orexin Loss. *Neurobiol. Learn. Mem.* 157, 41–47. doi:10.1016/j.nlm.2018.11.008
- Ebrahimpour, S., Zakeri, M., and Esmaeili, A. (2020). Crosstalk between Obesity, Diabetes, and Alzheimer's Disease: Introducing Quercetin as an Effective Triple Herbal Medicine. *Ageing Res. Rev.* 62, 101095. doi:10.1016/j.arr.2020.101095
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., et al. (1999). Increased Insulin Sensitivity and Obesity Resistance in Mice Lacking the Protein Tyrosine phosphatase-1B Gene. *Science* 283, 1544–1548. doi:10.1126/science.283.5407.1544
- Etchetot, M., Petrov, D., Pedrós, I., Alva, N., Carbonell, T., Beas-Zarate, C., et al. (2016). Evaluation of Neuropathological Effects of a High-Fat Diet in a Presymptomatic Alzheimer's Disease Stage in APP/PS1 Mice. *J. Alzheimers Dis.* 54, 233–251. doi:10.3233/JAD-160150
- Etchetot, M., Busquets, O., Cano, A., Sánchez-Lopez, E., Manzine, P. R., Espinoza-Jiménez, T., et al. (2020). Pharmacological Strategies to Improve Dendritic Spines in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 82, S91. doi:10.3233/JAD-201106
- Fourrier, C., Singhal, G., and Baune, B. T. (2019). Neuroinflammation and Cognition across Psychiatric Conditions. *CNS Spectr.* 24, 4–15. doi:10.1017/S1092852918001499
- Fuentes, F., Zimmer, D., Atienza, M., Schottenfeld, J., Penkala, I., Bale, T., et al. (2012). Protein Tyrosine Phosphatase PTP1B Is Involved in Hippocampal Synapse Formation and Learning. *PLoS ONE* 7, e41536. doi:10.1371/journal.pone.0041536
- Giordano Attianese, G. M., and Desvergne, B. (2015). Integrative and Systemic Approaches for Evaluating PPAR β / δ (PPARD) Function. *Nucl. Recept Signal* 13, e001. doi:10.1621/nrs.13001
- Hall, M. G., Quignodon, L., and Desvergne, B. (2008). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta/delta in the Brain: Facts and Hypothesis. *PPAR Res.* 2008, 780452–780482. doi:10.1155/2008/780452
- Hämäläinen, N., and Pette, D. (1995). Patterns of Myosin Isoforms in Mammalian Skeletal Muscle Fibres. *Microscopy Research and Technique* 30(5), 381–389. doi:10.1002/jemt.1070300505
- Harigaya, Y., Shoji, M., Shirao, T., and Hirai, S. (1996). Disappearance of Actin-Binding Protein, Drebrin, from Hippocampal Synapses in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci. Res.* 43, 87–92. doi:10.1002/jnr.490430111
- Hatanpää, K., Isaacs, K. R., Shirao, T., Brady, D. R., and Rapoport, S. I. (1999). Loss of Proteins Regulating Synaptic Plasticity in Normal Aging of the Human Brain and in Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 637–643. doi:10.1097/00005072-199906000-00008
- Hayashi, K., Ishikawa, R., Ye, L. H., He, X. L., Takata, K., Kohama, K., et al. (1996). Modulatory Role of Drebrin on the Cytoskeleton within Dendritic Spines in the Rat Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* 16, 7161–7170. doi:10.1523/jneurosci.16-22-07161.1996
- Heneka, M. T., and Landreth, G. E. (2007). PPARs in the Brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 1031–1045. doi:10.1016/j.bbaplp.2007.04.016
- Heneka, M. T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., Hanke, A., Dewachter, L., Kuiperi, C., et al. (2005). Acute Treatment with the PPAR γ Agonist Pioglitazone and Ibuprofen Reduces Glial Inflammation and A β 1-42 Levels in APPV717I Transgenic Mice. *Brain* 128, 1442–1453. doi:10.1093/brain/awh452
- Ivanov, A., Esclapez, M., and Ferhat, L. (2009a). Role of Drebrin A in Dendritic Spine Plasticity and Synaptic Function: Implications in Neurological Disorders. *Commun. Integr. Biol.* 2, 268–270. doi:10.4161/cib.2.3.8166
- Ivanov, A., Esclapez, M., Pellegrino, C., Shirao, T., and Ferhat, L. (2009b). Drebrin A Regulates Dendritic Spine Plasticity and Synaptic Function in Mature Cultured Hippocampal Neurons. *J. Cell. Sci.* 122, 524–534. doi:10.1242/jcs.033464
- Jin, X., Liu, M. Y., Zhang, D. F., Zhong, X., Du, K., Qian, P., et al. (2019). Baicalin Mitigates Cognitive Impairment and Protects Neurons from Microglia-Mediated Neuroinflammation via Suppressing NLRP3 Inflammasomes and TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *CNS Neurosci. Ther.* 25, 575–590. doi:10.1111/cns.13086
- Kalarchian, M. A., and Marcus, M. D. (2012). Psychiatric Comorbidity of Childhood Obesity. *Int. Rev. Psychiatry* 24, 241–246. doi:10.3109/09540261.2012.678818
- Kanoski, S. E., and Davidson, T. L. (2011). Western Diet Consumption and Cognitive Impairment: Links to Hippocampal Dysfunction and Obesity. *Physiol. Behav.* 103, 59–68. doi:10.1016/j.physbeh.2010.12.003
- Karim, N., Anghel, S., Joye, E., Nguan Soon, T., Sharmila, B.-M., Trono, D., et al. (2006). Differentiation of Trophoblast Giant Cells and Their Metabolic Functions Are Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta/delta. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3266. doi:10.1128/MCB.26.8.3266-3281.2006
- Kleinridders, A., Ferris, H. A., Cai, W., and Kahn, C. R. (2014). Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. *Diabetes* 63, 2232–2243. doi:10.2337/db14-0568
- Knott, G., and Holtmaat, A. (2008). Dendritic Spine Plasticity-Ccurrent Understanding from *In Vivo* Studies. *Brain Res. Rev.* 58, 282–289. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.01.002
- Kojima, N., and Shirao, T. (2007). Synaptic Dysfunction and Disruption of Postsynaptic Drebrin-Actin Complex: A Study of Neurological Disorders Accompanied by Cognitive Deficits. *Neurosci. Res.* 58, 1–5. doi:10.1016/j.neures.2007.02.003
- Leszek, J., Trypka, E., Tarasov, V. V., Ashraf, G. M., and Aliev, G. (2017). Type 3 Diabetes Mellitus: A Novel Implication of Alzheimers Disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 17, 1331–1335. doi:10.2174/1568026617666170103163403
- Lu, B., and Figurov, A. (1997). Role of Neurotrophins in Synapse Development and Plasticity. *Rev. Neurosci.* 8, 1–12. doi:10.1515/revneuro.1997.8.1.1
- Malpetti, M., Kievit, R. A., Passamonti, L., Jones, P. S., Tsvetanov, K. A., Rittman, T., et al. (2020). Microglial Activation and Tau Burden Predict Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *Brain* 143, 1588–1602. doi:10.1093/brain/awaa088
- McGrattan, A. M., McGuinness, B., McKinley, M. C., Kee, F., Passmore, P., Woodsides, J. V., et al. (2019). Diet and Inflammation in Cognitive Ageing

- and Alzheimer's Disease. *Curr. Nutr. Rep.* 8, 53–65. doi:10.1007/s13668-019-0271-4
- McNay, E. C., and Recknagel, A. K. (2011). Reprint of 'Brain Insulin Signaling: A Key Component of Cognitive Processes and a Potential Basis for Cognitive Impairment in Type 2 Diabetes'. *Neurobiol. Learn Mem.* 96, 517–528. doi:10.1016/j.nlm.2011.11.001
- Moreno, S., Farioli-vecchioli, S., and Cerù, M. P. (2004). Immunolocalization of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Retinoid X Receptors in the Adult Rat CNS. *Neuroscience* 123, 131–145. doi:10.1016/j.neuroscience.2003.08.064
- Musso, G., Gambino, R., De Michieli, F., Cassader, M., Rizzetto, M., Durazzo, M., et al. (2003). Dietary Habits and Their Relations to Insulin Resistance and Postprandial Lipemia in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 37, 909–916. doi:10.1053/jhep.2003.501312
- Neels, J. G., and Grimaldi, P. A. (2014). Physiological Functions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β . *Physiol. Rev.* 94, 795–858. doi:10.1152/physrev.00027.2013
- Nicolakakis, N., Aboulkassim, T., Ongali, B., Lecruc, C., Fernandes, P., Rosa-Neto, P., et al. (2008). Complete Rescue of Cerebrovascular Function in Aged Alzheimer's Disease Transgenic Mice by Antioxidants and Pioglitazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonist. *J. Neurosci.* 28, 9287–9296. doi:10.1523/JNEUROSCI.3348-08.2008
- Palomer, X., Barroso, E., Pizarro-Delgado, J., Peña, L., Botteri, G., Zarei, M., et al. (2018). Ppar β / δ : A Key Therapeutic Target in Metabolic Disorders. *Ijms* 19, 913. doi:10.3390/ijms19030913
- Peters, J. M., Lee, S. S., Li, W., Ward, J. M., Gavrilova, O., Everett, C., et al. (2000). Growth, Adipose, Brain, and Skin Alterations Resulting from Targeted Disruption of the Mouse Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta(delta). *Mol. Cell Biol.* 20 (14), 5119–5128. doi:10.1128/mcb.20.14.5119-5128.2000
- Porter, D. W., Kerr, B. D., Flatt, P. R., Holscher, C., and Gault, V. A. (2010). Four Weeks Administration of Liraglutide Improves Memory and Learning as Well as Glycaemic Control in Mice with High Fat Dietary-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes Obes. Metab.* 12, 891–899. doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01259.x
- Power, S. E., O'Connor, E. M., Ross, R. P., Stanton, C., O'Toole, P. W., Fitzgerald, G. F., et al. (2015). Dietary Glycaemic Load Associated with Cognitive Performance in Elderly Subjects. *Eur. J. Nutr.* 54, 557–568. doi:10.1007/s00394-014-0737-5
- Pugazhenthhi, S., Qin, L., and Reddy, P. H. (2017). Common Neurodegenerative Pathways in Obesity, Diabetes, and Alzheimer's Disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1863 (5), 1037–1045. doi:10.1016/j.bbdis.2016.04.017
- Qi, Z., Xu, Y., Liang, Z., Li, S., Wang, J., Wei, Y., et al. (2015). Baicalein Alters PI3K/Akt/GSK3 β Signaling Pathway in Rats with Diabetes-Associated Cognitive Deficits. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 1993
- Regen, F., Hellmann-Regen, J., Costantini, E., and Reale, M. (2017). Neuroinflammation and Alzheimer's Disease: Implications for Microglial Activation. *Curr. Alzheimer Res.* 14, 1140–1148. doi:10.2174/1567205014666170203141717
- Ricke, K. M., Cruz, S. A., Qin, Z., Farrokhi, K., Sharmin, F., Zhang, L., et al. (2020). Neuronal Protein Tyrosine Phosphatase 1B Hastens Amyloid β -Associated Alzheimer's Disease in Mice. *J. Neurosci.* 40, 1581–1593. doi:10.1523/JNEUROSCI.2120-19.2019
- Röckl, K. S., Hirschman, M. F., Brandauer, J., Fujii, N., Witters, L. A., and Goodyear, L. J. (2007). Skeletal Muscle Adaptation to Exercise Training: AMP-Activated Protein Kinase Mediates Muscle Fiber Type Shift. *Diabetes* 56, 2062–2069. doi:10.2337/db07-0255
- Rodríguez-Calvo, R., Serrano, L., Coll, T., Moullan, N., Sánchez, R. M., Merlos, M., et al. (2008). Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β / δ Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Cytokine Production in Adipocytes by Lowering Nuclear Factor-K κ B Activity via Extracellular Signal-Related Kinase 1/2. *Diabetes* 57, 2149. doi:10.2337/db08-0176
- Saiyasit, N., Chunchai, T., Prus, D., Suparan, K., Pittayapong, P., Apajai, N., et al. (2020). Gut Dysbiosis Develops before Metabolic Disturbance and Cognitive Decline in High-Fat Diet-Induced Obese Condition. *Nutr. (Burbank, Los Angel. Cty. Calif.)* 69, 576. doi:10.1016/j.nut.2019.110576
- Sala, C., and Segal, M. (2014). Dendritic Spines: the Locus of Structural and Functional Plasticity. *Physiol. Rev.* 94, 141–188. doi:10.1152/physrev.00012.2013
- Salvado, L., Serrano-Marco, L., Barroso, E., Palomer, X., and Vázquez-Carrera, M. (2012). Targeting PPAR β / δ for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Expert Opin. Ther. Targets* 16, 209–223. doi:10.1517/14728222.2012.658370
- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., and Mufson, E. J. (2006). Hippocampal Synaptic Loss in Early Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Neurobiol. Aging* 27, 1372–1384. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.012
- Schnegg, C. I., and Robbins, M. E. (2011). Neuroprotective Mechanisms of PPAR δ : Modulation of Oxidative Stress and Inflammatory Processes. *PPAR Res.* 2011, 373560. doi:10.1155/2011/373560
- Schuler, M., Ali, F., Chambon, C., Duteil, D., Bornert, J. M., Tardivel, A., et al. (2006). PGC1alpha Expression Is Controlled in Skeletal Muscles by PPARbeta, Whose Ablation Results in Fiber-type Switching, Obesity, and Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 4, 407–414. doi:10.1016/j.cmet.2006.10.003
- Sekino, Y., Kojima, N., and Shirao, T. (2007). Role of Actin Cytoskeleton in Dendritic Spine Morphogenesis. *Neurochem. Int.* 51, 92–104. doi:10.1016/j.neuint.2007.04.029
- Small, G. W., Ercoli, L. M., Silverman, D. H., Huang, S. C., Komo, S., Bookheimer, S. Y., et al. (2000). Cerebral Metabolic and Cognitive Decline in Persons at Genetic Risk for Alzheimer's Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6037–6042. doi:10.1073/pnas.090106797
- Song, G. J., Jung, M., Kim, J. H., Park, H., Rahman, M. H., Zhang, S., et al. (2016). A Novel Role for Protein Tyrosine Phosphatase 1B as a Positive Regulator of Neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 13, 86. doi:10.1186/s12974-016-0545-3
- Stranahan, A. M., Cutler, R. G., Button, C., Telljohann, R., and Mattson, M. P. (2011). Diet-induced Elevations in Serum Cholesterol Are Associated with Alterations in Hippocampal Lipid Metabolism and Increased Oxidative Stress. *J. Neurochem.* 118, 611–615. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07351.x
- Talbot, K., Wang, H. Y., Kazi, H., Han, L. Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., et al. (2012). Demonstrated Brain Insulin Resistance in Alzheimer's Disease Patients Is Associated with IGF-1 Resistance, IRS-1 Dysregulation, and Cognitive Decline. *J. Clin. Investig.* 122, 1316–1338. doi:10.1172/JCI59903
- Tan, N. S., Vázquez-Carrera, M., Montagner, A., Sng, M. K., Guillou, H., and Wahli, W. (2016). Transcriptional Control of Physiological and Pathological Processes by the Nuclear Receptor PPAR β / δ . *Prog. Lipid Res.* 64, 98–122. doi:10.1016/j.plipres.2016.09.001
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., et al. (1991). Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer's Disease: Synapse Loss Is the Major Correlate of Cognitive Impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572–580. doi:10.1002/ana.410300410
- Thomson, D. M., Porter, B. B., Tall, J. H., Kim, H. J., Barrow, J. R., and Winder, W. W. (2007). Skeletal Muscle and Heart LKB1 Deficiency Causes Decreased Voluntary Running and Reduced Muscle Mitochondrial Marker Enzyme Expression in Mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E196–E202. doi:10.1152/ajpendo.00366.2006
- Tong, M., Deochand, C., Didsbury, J., and De La Monte, S. M. (2016). T3D-959: A Multi-Faceted Disease Remedial Drug Candidate for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 51, 123–138. doi:10.3233/JAD-151013
- Tong, M., Dominguez, C., Didsbury, J., and de la Monte, S. M. (2016). Targeting Alzheimer's Disease Neuro-Metabolic Dysfunction with a Small Molecule Nuclear Receptor Agonist (T3D-959) Reverses Disease Pathologies. *J. Alzheimers Dis. Park.* 6, 238. doi:10.4172/2161-0460.1000238
- Tongiorgi, E. (2008). Activity-dependent Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Dendrites: Facts and Open Questions. *Neurosci. Res.* 61, 335–346. doi:10.1016/j.neures.2008.04.013
- Tongiorgi, E., Righi, M., and Cattaneo, A. (1997). Activity-dependent Dendritic Targeting of BDNF and TrkB mRNAs in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 17, 9492–9505. doi:10.1523/jneurosci.17-24-09492.1997
- Tumminia, A., Vinciguerra, F., Parisi, M., and Frittitta, L. (2018). Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: Role of Insulin Signalling and Therapeutic Implications. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (11), 306. doi:10.3390/ijms19113306
- Vázquez-Carrera, M. (2016). Unraveling the Effects of PPAR β / δ on Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. *Trends Endocrinol. Metabolism* 27, 319. doi:10.1016/j.tem.2016.02.008

- Wang, D., Yan, J., Chen, J., Wu, W., Zhu, X., and Wang, Y. (2015). Naringin Improves Neuronal Insulin Signaling, Brain Mitochondrial Function, and Cognitive Function in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Cell. Mol. Neurobiol.* 35, 1061–1071. doi:10.1007/s10571-015-0201-y
- Wang, Y. X., Zhang, C. L., Yu, R. T., Cho, H. K., Nelson, M. C., Bayuga-Ocampo, C. R., et al. (2004). Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPARdelta. *PLoS Biol.* 2, e294. doi:10.1371/journal.pbio.0020294
- Willmes, C. G., Mack, T. G., Ledderose, J., Schmitz, D., Wozny, C., and Eickholt, B. J. (2017). Investigation of Hippocampal Synaptic Transmission and Plasticity in Mice Deficient in the Actin-Binding Protein Drebrin. *Sci. Rep.* 7, 42652. doi:10.1038/srep42652
- Yang, A. J. T., MacPherson, R. E. K., and E K MacPherson, R. (2019). Resveratrol and Metformin Recover Prefrontal Cortex AMPK Activation in Diet-Induced Obese Mice but Reduce BDNF and Synaptophysin Protein Content. *J. Alzheimers Dis.* 71, 945–956. doi:10.3233/JAD-190123
- Yang, L., Zhang, X., Li, S., Wang, H., Zhang, X., Liu, L., et al. (2020). Intranasal Insulin Ameliorates Cognitive Impairment in a Rat Model of Parkinson's Disease through Akt/GSK3 β Signaling Pathway. *Life Sci.* 259, 118159. doi:10.1016/j.lfs.2020.118159
- Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2001). Morphological Changes in Dendritic Spines Associated with Long-Term Synaptic Plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1071–1089. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1071
- Zhang, J., Yu, C., Zhang, X., Chen, H., Dong, J., Lu, W., et al. (2018a). Porphyromonas Gingivalis Lipopolysaccharide Induces Cognitive Dysfunction, Mediated by Neuronal Inflammation via Activation of the TLR4 Signaling Pathway in C57BL/6 Mice. *J. Neuroinflammation* 15, 37. doi:10.1186/s12974-017-1052-x
- Zhang, X., Shen, X., Dong, J., Liu, W. C., Song, M., Sun, Y., et al. (2019). Inhibition of Reactive Astrocytes with Fluorocitrate Ameliorates Learning and Memory Impairment through Upregulating CRTCI and Synaptophysin in Ischemic Stroke Rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 39 (8), 1151–1163. doi:10.1007/s10571-019-00709-0
- Zhang, Y., Huang, N. Q., Yan, F., Jin, H., Zhou, S. Y., Shi, J. S., et al. (2018b). Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: GSK-3 β as a Potential Link. *Behav. Brain Res.* 339, 57–65. doi:10.1016/j.bbr.2017.11.015
- Zhang, Z. Y., and Lee, S. Y. (2003). PTP1B Inhibitors as Potential Therapeutics in the Treatment of Type 2 Diabetes and Obesity. *Expert Opin. Investig. Drugs* 12, 223–233. doi:10.1517/13543784.12.2.223
- Zilliox, L. A., Chadrasekaran, K., Kwan, J. Y., and Russell, J. W. (2016). Diabetes and Cognitive Impairment. *Curr. Diab Rep.* 16, 87. doi:10.1007/s11892-016-0775-x

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors, and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Espinosa-Jiménez, Busquets, Cano, Sánchez-López, Verdager, Parcerisas, Olloquequi, Auladell, Folch, Wahli, Vázquez-Carrera, Camins and Etcheto. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Publicación II

A novel rhein-huprine hybrid ameliorates disease-modifying properties in preclinical mice model of Alzheimer's disease exacerbated with high fat diet

Triana Espinosa-Jiménez^{1,2,3}, Amanda Cano^{3,4,5,6}, Elena Sánchez-López^{3,4,6,7}, Jordi Olloquequi^{8,9}, Jaume Folch^{3,10,11}, Mònica Bulló^{10,11,12}, Ester Verdaguer^{2,3,13}, Carme Auladell^{2,3,13}, Caterina Pont¹⁴, Diego Muñoz-Torrero^{14,15}, Antoni Parcerisas¹⁶, Antoni Camins^{1,2,3}, Miren Ettcheto^{1,2,3}.
Cell & Bioscience, 2023 13:52

doi: 10.1186/s13578-023-01000-y

JCR 2021 IF: 9,597

Afiliaciones:

¹ Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Science, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

² Institute of Neuroscience, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

³ Biomedical Research Networking Centre in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain.

⁴ Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona, Spain.

⁵ Ace Alzheimer Center Barcelona – International University of Catalunya (UIC), Barcelona, Spain.

⁶ Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

⁷ Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, IQAC-CSIC, 08034 Barcelona, Spain.

⁸ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

⁹ Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, Universidad Autónoma de Chile, Talca, Chile.

¹⁰ Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), 43201 Reus, Spain.

¹¹ Institute of Health Pere Virgili—IISPV, Nutrition and Metabolic Health Research Group, 43201 Reus, Spain.

¹² CIBER Physiology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Carlos III Health Institute, 28029 Madrid, Spain.

¹³ Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Spain.

¹⁴ Laboratory of Medicinal Chemistry (CSIC Associated Unit), Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

¹⁵ Institute of Biomedicine (IBUB), Universitat de Barcelona, Spain.

¹⁶ Department of Basic Sciences, Universitat Internacional de Catalunya (UIC), Sant Cugat del Vallès, Spain.

Resumen

La EA se caracteriza por tener un origen polietiológico. A pesar de la gran cantidad de casos a nivel mundial y de los grandes avances realizados en la búsqueda de nuevos fármacos, la cura para esta enfermedad sigue sin ser encontrada. Sorprendentemente, un creciente número de estudios han indicado una relación existente entre la DMT2 y la EA, ya que ambas enfermedades comparten algunos eventos patológicos. De hecho, BACE1 y la AChE son consideradas dianas prometedoras para ambas patologías. En este sentido, debido al origen multifactorial de estas enfermedades, las investigaciones actuales en la búsqueda de nuevas terapias se están centrando cada vez más en el desarrollo de moléculas multidiana como una opción prometedora para dar lugar a tratamientos efectivos para estas condiciones.

De esta forma, el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto del híbrido RHE-HUP, inhibidor de la agregación de Tau y de la AChE, en ratones APP/PS1 hembra de 6 meses de edad, junto con el consumo de una dieta rica en grasa para simular concomitantemente una condición similar a la DMT2.

La inyección intraperitoneal con RHE-HUP a una dosis de 2.0 mg/Kg tres veces a la semana durante cuatro semanas redujo los principales eventos característicos de la EA, incluyendo la hiperfosforilación de Tau, los niveles de A β ₄₂ y la formación de placas. Además, se encontró una disminución en la respuesta inflamatoria junto con un aumento de diferentes proteínas sinápticas, como drebrina 1 (DBN1) o sinaptofisina, y de factores neurotróficos, especialmente en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain derived neurotrophic factor*), que se correlacionaron con una recuperación del número de espinas dendríticas, lo que resultó en una mejora de la memoria. Es de destacar, que la mejora observada en este modelo puede ser atribuida directamente a una regulación a nivel central, ya que no se

observaron modificaciones de las alteraciones periféricas originadas por la dieta rica en grasa.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que el fármaco RHE-HUP podría ser un nuevo candidato para el tratamiento de la EA, incluso para aquellos individuos con un alto riesgo debido a alteraciones metabólicas periféricas, gracias al perfil multidiana de esta molécula que permite la mejora de algunas de las características más importantes de la enfermedad.

RESEARCH

Open Access



A novel rhein-huprine hybrid ameliorates disease-modifying properties in preclinical mice model of Alzheimer's disease exacerbated with high fat diet

Triana Espinosa-Jiménez^{1,2,3}, Amanda Cano^{3,4,5,6}, Elena Sánchez-López^{3,4,6,7}, Jordi Olloquequi^{8,3,2,9},
Jaume Folch^{3,10,11}, Mònica Bulló^{10,11,12}, Ester Verdaguer^{2,3,13}, Carme Auladell^{2,3,13}, Caterina Pont¹⁴,
Diego Muñoz-Torrero^{14,15}, Antoni Parcerisas¹⁶, Antoni Camins^{1,2,3} and Miren Ettcheto^{1,2,3,17*} 

Abstract

Background Alzheimer's disease (AD) is characterized by a polyetiological origin. Despite the global burden of AD and the advances made in AD drug research and development, the cure of the disease remains elusive, since any developed drug has demonstrated effectiveness to cure AD. Strikingly, an increasing number of studies indicate a linkage between AD and type 2 diabetes mellitus (T2DM), as both diseases share some common pathophysiological features. In fact, β -secretase (BACE1) and acetylcholinesterase (AChE), two enzymes involved in both conditions, have been considered promising targets for both pathologies. In this regard, due to the multifactorial origin of these diseases, current research efforts are focusing on the development of multi-target drugs as a very promising option to derive effective treatments for both conditions.

In the present study, we evaluated the effect of rhein-huprine hybrid (RHE-HUP), a synthesized BACE1 and AChE inhibitor, both considered key factors not only in AD but also in metabolic pathologies. Thus, the aim of this study is to evaluate the effects of this compound in APP/PS1 female mice, a well-established familial AD mouse model, challenged by high-fat diet (HFD) consumption to concomitantly simulate a T2DM-like condition.

Results Intraperitoneal treatment with RHE-HUP in APP/PS1 mice for 4 weeks reduced the main hallmarks of AD, including Tau hyperphosphorylation, $A\beta_{42}$ peptide levels and plaque formation. Moreover, we found a decreased inflammatory response together with an increase in different synaptic proteins, such as drebrin 1 (DBN1) or synaptophysin, and in neurotrophic factors, especially in BDNF levels, correlated with a recovery in the number of dendritic spines, which resulted in memory improvement. Notably, the improvement observed in this model can be attributed directly to a protein regulation at central level, since no peripheral modification of those alterations induced by HFD consumption was observed.

Conclusions Our results suggest that RHE-HUP could be a new candidate for the treatment of AD, even for individuals with high risk due to peripheral metabolic disturbances, given its multi-target profile which allows for the improvement of some of the most important hallmarks of the disease.

*Correspondence:

Miren Ettcheto
mirenettcheto@ub.edu

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2023 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Keywords Rhein-huprine hybrid, Dendritic spines, Cognitive decline, Alzheimer's disease, High-fat diet, BDNF, BACE1, Neuroinflammation, Tau, TLR4

Background

Alzheimer's disease (AD) is defined as a chronic neurodegenerative disease that involves a progressive and irreversible memory loss, followed by a state of total dementia, as well as behavioral disturbances [1, 2]. This neurodegenerative disorder considered the most common form of dementia worldwide [3], displays a high prevalence and increasing incidence, especially among elderly people. In fact, about 33.9 million people worldwide are suffering from AD, and it is expected to triple over the next 40 years [4, 5].

AD is mainly characterized by the presence of abundant extracellular amyloid-beta peptide deposits (A β) and intracellular hyperphosphorylated Tau protein (p-Tau), that accumulate to form senile plaques and neurofibrillary tangles (NFTs) respectively, both contributing to neuronal loss [6, 7]. A β plaques are produced by the proteolytic cleavages of the amyloid precursor protein (APP) by the beta-secretase 1 (BACE1) enzyme activity and subsequently by γ -secretase, resulting in A β peptides of different length, including 38, 40 and 42 amino acids (aa). Specifically, those A β composed by 42 aa readily tend to aggregate, resulting in A β plaque formation [8, 9]. Phosphorylation is the major modification of Tau protein and it has been described as a critical step in the formation of NFTs [10]. Evidence suggests that A β plaques could be involved in the induction of aberrant Tau phosphorylation, thus supporting a causal crosslink between these two pathogenic processes [11–13]. In addition, the aggregation of A β into oligomers and fibrils in the brain is also modified by factors such as acetylcholinesterase (AChE), which precipitates the formation of toxic aggregates by accelerating A β deposition and increasing its neurotoxicity, contributing to neuroinflammation, oxidative stress and synaptic dysfunction [14, 15]. Additionally, the role of AChE in AD goes much further, since numerous studies have shown the existence of a cholinergic deficit in AD patients due to the modification in the activity of AChE and the decrease in acetylcholine levels [16, 17]. In fact, some of the compounds used as anti-AD drugs like donepezil, galantamine and rivastigmine are AChE inhibitors [18]. However, none of them have been able to totally stop the progression of pathology. For this reason, new approaches to its etiology are being studied nowadays [19]. In addition, it has been described that elevated AChE concentrations could also trigger the systemic inflammation, key in T2DM and AD, representing an interesting therapeutic target for both diseases, which

support previous studies that described the possible relationship between AD and metabolic alterations [20–22], stressing AD as a multifactorial disease. In fact, obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM) and metabolic syndrome, all associated with insulin resistance, are recognized risk factors for cognitive disturbances [23–25] and type 3 diabetes has been proposed as a term to describe the complex interlink between insulin resistance and AD [26–28].

Hence, the regulation of metabolic alterations could be an effective strategy to reduce cognitive decline and dementia [29]. In this way, some studies have shown the role of BACE1 in AD progression, not only as a key regulator of the formation of the A β peptide but also its function in metabolic regulation [30, 31]. In fact, it has been demonstrated that subtle neuronal expression of human BACE1 resulted in AD phenotypes alongside systemic T2DM-like symptoms, suggesting that BACE1 inhibitors could be used for the treatment of T2DM-associated pathologies [32].

Taken together, evidence suggests that AD is a complex disorder that arises from multiple molecular alterations, therefore, the design of drugs with multiple biological targets could be key for an effective treatment [33]. A recent developed multi-target RHE-HUP hybrid compounds [34] combine the pharmacophores of rhein, a natural product structurally related to some hydroxy-anthraquinones with tau anti-aggregating activity, and huprine Y, a strong AChE inhibitor. RHE-HUP displays a strong *in vitro* activity against its primary targets (tau aggregation and AChE) and a not less strong BACE1 inhibitory activity. Studies conducted *in vivo* [35] have demonstrated that RHE-HUP reduced A β levels, Tau phosphorylation and memory impairment in an APP^{swe}/PS-1dE9 double transgenic mouse model. However, the effect of RHE-HUP on metabolic dysregulation associated to AD has not been evaluated yet. For this reason, the aim of our study was to evaluate the efficacy of this new compound in the progression of AD when it is comorbid with metabolic alterations generated by the chronic consumption of a high-fat diet (HFD).

Methods

Animals and treatment

6 month old female APP^{swe}/PS1dE9 (APP/PS1) double transgenic mice and wild-type (WT) littermates with the same genetic background (C57BL/6) were used. This animal model was chosen according to previous

studies reporting that female mice develop higher progressive memory impairment and AD-like neuropathology compared to male mice [36, 37]. These transgenic mice express a Swedish (K594M/N595L) mutation of a chimeric mouse/human APP (mo/huAPP695swe), together with the human exon-9-deleted variant of PS1 (PS1-dE9). In all cases, animals were obtained from established breeding couples in the animal facility (Animal facility from the Faculty of Pharmacy and Food Sciences of the University of Barcelona; approval number C-0032). After the weaning, at 21 days old, and throughout their growth, animals were fed with conventional chow (control diet, CT; ENVIGO, Madison, Wt 53744–4220) or with a palmitic acid-enriched diet containing 60% of fat mainly from hydrogenated coconut oil (HFD) (Research Diets Inc., NB, US). RHE-HUP hybrid (+)-(7R,11R)-N-[9-[(3-chloro-6,7,10,11-tetrahydro-9-methyl-7,11-methanocycloocta[b]quinolin-12-yl)amino]nonyl]-9,10-dihydro-4,5-dihydroxy-9,10-dioxoanthracene-2-carboxamide was prepared as previously reported [38]. When animals were 5 months old, they were treated intraperitoneally (i.p.), either with saline solution or with RHE-HUP at a dose of 2.0 mg/Kg and diluted in bidistilled water with 3% DMSO, three times per week during 4 weeks (Fig. 1). Thus, the study included three experimental groups: WT CT SALINE, APP/PS1 HFD SALINE and APP/PS1 HFD RHE-HUP.

All animals were kept under stable conditions of humidity and temperature, standard light-dark cycle (12 h light/dark cycle) and food and water ad libitum following the ethical guidelines defined by the European Committee (European Communities Council Directive 2010/63/EU). Manipulation protocols were previously approved by the ethics committee from the University of Barcelona, and, at all times, it was made sure that animal numbers, their stress, and pain were kept under a necessary minimum following the appropriate animal manipulation ethical methodologies. All the experiments were performed in accordance with the European Community Council Directive 86/609/EEC and the procedures were established by the Department d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of the Generalitat de Catalunya.

Glucose and insulin tolerance tests

Mice were fasted for 6 h and the tests were performed in a room preheated to +28 °C. For the glucose tolerance test (GTT), glucose was administered at a dose of 1 g/Kg i.p. For the insulin tolerance test (ITT), a dose of 0.75 IU/Kg was used. Samples from the tail vein were extracted in consecutive periods. Glucose was measured using an Accu-check® Aviva glucometer at 5, 15, 30, 60 and 120 min after glucose administration and at 15, 30, 45, 60 and 90 min after the insulin administration. To those animals in which blood glucose levels dropped under a

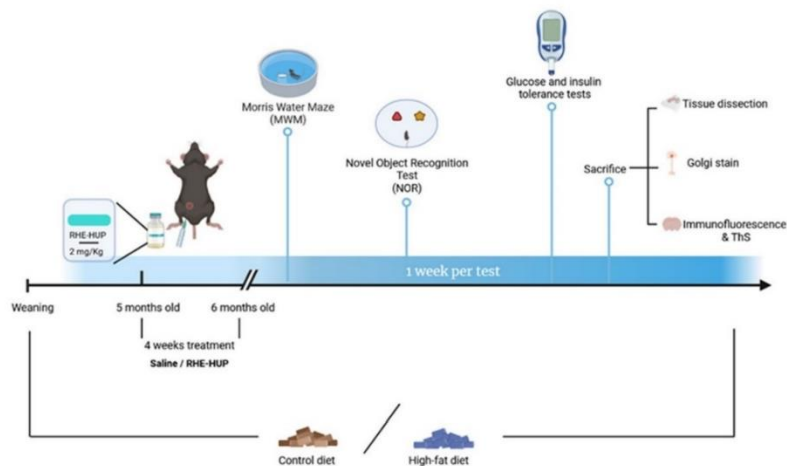


Fig. 1 Graphical representation of experimental design. 6 month-old female APP/PS1 and WT littermates were used. After the weaning, animals were fed either control or HFD. When animals were 5 months old, they were treated intraperitoneally (i.p.), either with saline solution or with RHE-HUP at a dose of 2.0 mg/Kg. Then, animals were subjected to two different behavioral tests: MWM and NOR. After that, GTT and ITT were performed and animals were sacrificed by cervical dislocation in order to obtain tissue samples and to perform Golgi Staining Kit, or by intracardially perfusion for immunochemistry/ThS

concentration of 20 mg/dl in the ITT, a dosage of 1 g/Kg of glucose was administered i.p. 13 animals per group were used.

Behavioral tests assessments

- Morris water maze (MWM)

Hippocampal spatial memory and learning memory were assessed by the Morris Water Maze (MWM) test, which was performed as previously reported [39]. Acquired data was analyzed using SMART V3.0 (Panlab Harvard Apparatus, Germany) video tracking system. 13 animals per group were utilized.

- Novel object recognition test (NORT)

NORT was used to assess the hippocampal-dependent recognition memory. 13 animals per group were evaluated in a room with a circular open-field arena of 40 cm in diameter surrounded by black curtains and constant illumination (30 lx) as it has been previously detailed [40]. Data were analyzed by discrimination index (DI) which was calculated using the following equation:

$$DI = \frac{B \text{ exploration time} - A \text{ exploration time}}{\text{Total exploration time}}$$

All spaces were properly cleaned with 96% ethanol between animals, in order to eliminate odor or other cues. Data was measured and represented in seconds.

Immunoblot analysis

At 6 months, 4–5 animals of each group were sacrificed by cervical dislocation and the liver and hippocampus were dissected and kept at – 80 °C until use. To perform hippocampi and liver extractions, tissues were homogenized in lysis buffer (Tris HCl 1 M pH 7.4, NaCl 5 M, EDTA 0.5 M pH 8, Triton, distilled H2O) containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Complete Mini, EDTA-free; Protease Inhibitor cocktail tablets). Total protein concentration was determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™). Samples containing 10 µg of protein were analyzed by Western Blot as previously described [41]. Measurements were expressed in arbitrary units and all results were normalized with the corresponding loading control (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH). The used antibodies are detailed in Table 1.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

BDNF (Cusabio, China; CSB-E04505m) and amyloid β₁₋₄₂ (ThermoFisher Scientific; kit KHB3441) levels in the

Table 1 Primary and secondary antibodies for Western Blotting

Protein	Antibody
ADAM10	ab124695 (abcam)
App	SIG-39152 (Convence)
App C terminal fragment	SIG-39152 (Convence)
DBN1	ABN 207 (Merck Millipore)
GAPDH	MAB374 (Merck Millipore)
GSK3β	#9315 (Cell Signaling Technology)
P-GSK3β (TYR216)	ab75745 (abcam)
IDE	ab32216 (abcam)
IRS2	45025 (Cell Signaling)
Neurexin	ab34245 (abcam)
PTP1B	GTX55767 (Genetex)
sAPPβ	SIG-39138-0 (Covance)
Synaptophysin	M0776 (Dako)
Tau	GTX112981 (Genetex)
P-Tau(ser396)	44752G (Invitrogen)
P-Tau(ser404)	44-758G(Invitrogen)
TLR4	Sc-293072 (Santa Cruz Biotechnology)
B-actin	A5441 (Sigma)
2nd-ary Goat anti-Rabbit	31460 (Invitrogen)
2nd-ary Goat anti-Mouse	31430 (Invitrogen)

cerebral cortex homogenate were detected by ELISA according to manufacturer’s instruction. In both cases, 7 animals per group were analyzed and absorbances were read in a Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific). Amyloid β₁₋₄₂ data is expressed in pg/µg protein and BDNF levels are expressed in pg/mg protein.

β-secretase activity assay kit

Hippocampal tissue from 7 animals were homogenized according to the manufacturer protocol (Abcam; Kit ab282921), and 35 µL of each sample were placed into a 96 well black plate. BACE1 Positive Control and EDANS Standard Curve were also added to the plate. Following the addition of the Reaction Mix, the plate was measured at Ex/Em = 345/500 nm in a kinetic mode for 60 min at 37 °C. Data was treated as specified in the manufacturer’s instructions.

Immunofluorescence and thioflavin-S staining

15 animals were previously anesthetized by i.p. injection of ketamine (100 mg/Kg) and xylazine (10 mg/Kg). When they were in the no-pain sleep phase, they were intracardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB). After perfusion, brains were removed and stored in 4% PFA at 4 °C overnight (O/N). The next day, the solution was replaced by 4% PFA + 30% sucrose. Coronal sections of 20 µm

were obtained by a cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and they were kept in a cryoprotectant solution and stored at -20°C until use. To perform the experiments, the free-floating technique was used. Briefly, free-floating sections were rinsed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.35, and after that in PBS-T (PBS 0.1 M, 0.2% Triton X-100). Then they were incubated in a blocking solution (10% fetal bovine serum (FBS), 1% Triton X-100, PBS 0.1 M + 0.2% gelatin) for 1–2 h at room temperature. Later, sections were washed with PBS-T and incubated O/N at 4°C with the corresponding primary antibody (Table 2). Brain slices were washed with PBS-T and incubated with the corresponding secondary antibody (Table 2) for 2 h at room temperature. Thioflavin-S (ThS) protocol was carried out as previously described [42]. Finally, sections were treated with 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, United States), used for cell nuclei staining, for 8 min in the dark at room temperature and washed with 0.1 M PBS. All reagents, containers and materials exposed to Hoechst were properly handled and processed to avoid any cytotoxic contamination. Ultimately, all the samples were mounted in Superfrost[®] microscope slides using Fluoromount medium (EMS) and were left to dry O/N. Image acquisition was obtained using an epifluorescence microscope (BX61 Laboratory Microscope, Melville, NY Olympus America Inc.) and quantified by ImageJ. 5 animals per group were analyzed.

Hippocampal dendritic spine density analysis

To carry out the spine density analysis, 5 mice in each group were sacrificed by cervical dislocation. Brains were isolated and processed following the instructions of the GolgiStainTM Kit purchased from FD Neurotechnologies, Inc. (FD Rapid GolgiStainTM Kit; Cat #PK401). Images were obtained with a Leica Thunder Microscope (Leica Thunder Imager; Leica Microsystems). The quantification was carried out in 2 different zones, dentate gyrus (DG) and CA1, and 5 neurons per zone and animal were selected. DG was quantified in the secondary branches of the final fragment of the dendrites. In the DG, when analyzing the terminal fragment, 20 μm of dendrite were always left uncounted, and the counting was performed

in the following 30 μm . In secondary branches, 20 μm from the ramification were left uncounted and the following 30 μm were analyzed. In CA1, two zones of the neuron were distinguished: CA1 basal and CA1 apical. In CA1 basal, the final part of the dendrite was selected, and again 20 μm of dendrite were always left uncounted, and the counting were performed in the following 30 μm . In CA1 apical, the secondary branches were selected, leaving 20 μm uncounted and analyzing the next 30 μm . Spine density was expressed as the number of spines per 30 μm of dendrite. 5 animals per group were analyzed.

Statistical analysis

All results are presented as mean \pm standard deviation (SD). Normality test was performed, when data followed a parametric distribution and more than two groups were compared, significant differences were determined by one-way analysis of variances (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test for comparison among groups. When only two groups were compared, Student's t test was performed. However, when data followed a non-parametric distribution, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were performed to compare two or more than three groups, respectively. All analyses were obtained using Graph Pad Prism software for Mac version 6.01; Graph Pad Software, Inc.

Results

RHE-HUP does not reverse the body weight increase and glucose pathway alterations induced by HFD at peripheral level

As it has been widely described, the consumption of HFD is related to the increase in body weight, as well as to hyperglycemia and insulin resistance in mice [43, 44]. As expected, animals following a HFD showed a significant 6 month increased body weight compared with WT CT SALINE group ($p < 0.0001$) (Fig. 2a). The RHE-HUP treatment did not attenuate the weight gain induced by the HFD. Regarding glucose and insulin metabolism, HFD feeding showed a significant effect in both GTT (WT CT SALINE vs APP/PS1 HFD SALINE $p < 0.001$; WT CT SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.001$) and ITT (WT CT SALINE vs APP/PS1 HFD SALINE $p < 0.001$; WT CT SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.001$), regardless of the treatment (Fig. 2b–e). Because the insulin receptor substrate protein 2 (IRS2) is a key target in the hormonal control of metabolism, we measured the hepatic IRS2 protein level. A significant decrease in APP/PS1 HFD SALINE compared with WT CT SALINE ($p < 0.01$) was detected. However, no significant reduction was observed after the RHE-HUP treatment (Fig. 2f) suggesting that RHE-HUP does not regulate metabolic alterations observed after HFD consumption.

Table 2 Primary and secondary antibodies for Immunofluorescence

Protein	Antibody
GFAP	Z0334 (Dako)
IBA1	O19-19741 (Wako)
2nd-ary Alexa Fluor 488 (Goat-AntiMouse)	A11001 (Life Technologies)
2nd-ary Alexa Fluor 594 (Goat-Anti Rabbit)	A11080 (Life Technologies)

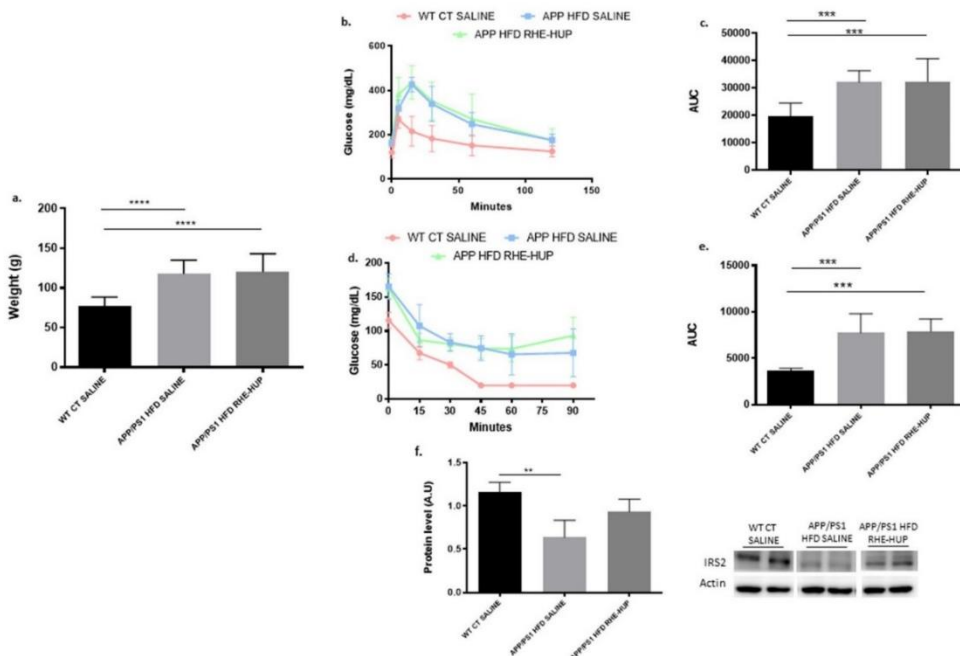


Fig. 2 a. Analysis and representation of changes in body weight (n = 13 animals per group). **b.** GTT and **d.** ITT experiment profiles (n = 13 animals per group). Area under curve (AUC) data were calculated from the time point 0 until the end of the experiment for both **c.** GTT and **e.** ITT. **f.** Semi-quantification of IRS2 levels in the liver where two representative samples out of four or five per group are shown (n = 4–5). All results were represented as mean ± SD. Statistical analysis was conducted through one-way ANOVA and Tukey post-test, except in the case of the analysis of weights, where the Kruskal–Wallis test was performed. In all cases, ** p < 0.01, *** p < 0.001 and **** p < 0.0001

RHE-HUP treatment improves brain insulin signaling and attenuates Tau hyperphosphorylation

Alterations in the insulin signaling pathway have been observed in brains of AD patients [45, 46], in which IRS2 represents an important component. Our results demonstrated that the hippocampal levels of IRS2 were significantly decreased in the group APP/PS1 HFD SALINE compared with the control group (p < 0.05). Surprisingly, a recovery in IRS2 was observed after RHE-HUP treatment (p < 0.05) (Fig. 3). Since the increase in IRS2 levels has been related with an attenuation in Tau hyperphosphorylation [47], we evaluated the glycogen synthase kinase-3β (GSK3β), a main Tau kinase converging between AD and insulin resistance. Our results displayed a non-significant upward trend in the group APP/PS1 HFD SALINE when compared with WT CT SALINE. By contrast, those animals treated with RHE-HUP showed a significant decrease of GSK3β phosphorylation levels in tyrosine 216 when compared to the APP/PS1 HFD SALINE mice (p < 0.05) (Fig. 3). Regarding Tau

phosphorylation in the hippocampus, our results showed a significant increase in P-Tau levels at serine 404 and serine 396 in APP/PS1 HFD SALINE mice when comparing with WT CT SALINE (P-Tau_{ser404} p < 0.05; P-Tau_{ser396} p < 0.001) and this effect was significantly reduced after RHE-HUP treatment (P-Tau_{ser404} p < 0.01; P-Tau_{ser396} p < 0.05). Our data did not show any significant changes in total Tau protein levels (Fig. 3).

RHE-HUP reduces Aβ plaques by regulating APP processing and Aβ degradation in APP/PS1 mice fed with HFD

To assess the state of Aβ burden in the hippocampus and cortex, ThS was used for detection of senile plaques. Our results demonstrated a significant decrease in the number of plaques after treatment in both regions, as shown in the images (Fig. 4a–c) and in the graphic representation (p < 0.05) (Fig. 4d–e). This result was corroborated with the significant reduction of Aβ (1–42) levels (p < 0.05) observed in the cortex after RHE-HUP

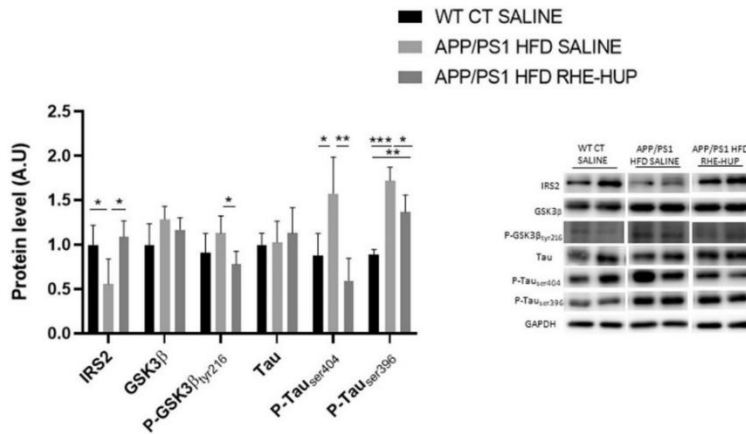


Fig. 3 Semi-quantification of hippocampal insulin signaling pathway related proteins and Tau. Two representative samples out of four or five per group are shown (n=4–5). All results were represented as mean ± SD. Groups were compared against each other using one-way ANOVA and Tukey post-test, except in the case of Tau protein, where Kruskal–Wallis was performed. In all cases, * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.01

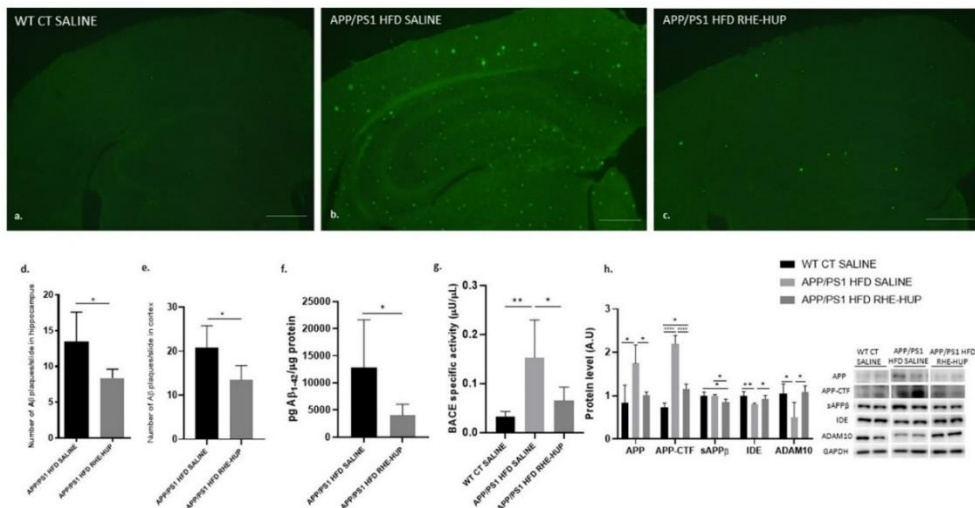


Fig. 4 a–c. Illustrative images of Aβ plaques in the hippocampus and cortex. Scale bar: 200 μm. Graphic representation of Aβ plaques quantification in d. hippocampus and e. cortex (n = 5 independent samples per group, with at least 5 slices analyzed per sample). In hippocampus analysis, Mann–Whitney test was performed, * p < 0.05. In cortex analysis, t-test was performed, where * p < 0.05. f. Measurement of the levels of Aβ₄₂ peptide in the cortex (n = 7). Statistical analysis was performed by T-test, where * p < 0.05. g. Determination of β-secretase activity in the hippocampus (n = 7). Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey’s post-test, where * p < 0.05 and ** p < 0.01. h. APP processing related protein levels. Two representative samples out of four or five per group are shown (n = 4–5). All results were represented as mean ± SD. Groups were compared against each other using one-way ANOVA and Tukey post-test, * p < 0.05, ** p < 0.01 and **** p < 0.0001

administration (Fig. 4f). To elucidate the mechanisms by which RHE-HUP induced A β reduction, the analysis of APP processing and A β degradation was performed. Regarding the first one, full-length APP was analyzed. As expected, non-treated transgenic mice showed a significant increase in this protein level ($p < 0.05$) whereas these levels were reduced in those animals treated with RHE-HUP ($p < 0.05$) (Fig. 4h). In this line, BACE1 activity also showed a significant increase in APP/PS1 HFD SALINE when compared with WT CT SALINE ($p < 0.01$) and decreased after treatment ($p < 0.05$) (Fig. 4g).

APP-C-terminal fragment (APP-CTF) was significantly increased in non-treated transgenic mice compared to control group whereas soluble amyloid precursor protein β fragment (sAPP β) did not show differences in WT vs APP/PS1 HFD. However, both proteins were reduced after treatment (APP-CTF: WT CT SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.05$; APP/PS1 HFD SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.0001$; sAPP β : WT CT SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.05$; APP/PS1 HFD SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.05$).

The insulin-degrading enzyme (IDE) is one of the main proteases involved not only in the degradation of insulin but also in that of A β peptide [48]. Our results showed

a significant reduction in the hippocampus of APP/PS1 HFD SALINE mice compared to WT CT SALINE, levels which were recovered after RHE-HUP treatment (WT CT SALINE vs APP/PS1 HFD SALINE $p < 0.01$; APP/PS1 HFD SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.05$). Similarly, ADAM10, a neuroprotective protein involved in the non-amyloidogenic pathway, experienced a significant reduction in APP/PS1 HFD SALINE ($p < 0.05$) when compared with WT CT SALINE mice, levels that were recovered after RHE-HUP treatment, reaching values similar to those of controls ($p < 0.05$) (Fig. 4h).

RHE-HUP treatment decreases glial reactivity in APP/PS1 HFD mice

Increasing evidence correlates neuroinflammation with the development of AD [49, 50]. In our study, the evaluation of astrocytes and microglial reactive profile was studied in the dentate gyrus of the hippocampus by detecting glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1), astrocyte and microglial markers, respectively (Fig. 5a–f). Our results showed a glial activation in those transgenic animals fed with HFD compared to WT and a clear reduction of this reactivity after the RHE-HUP treatment. These results were

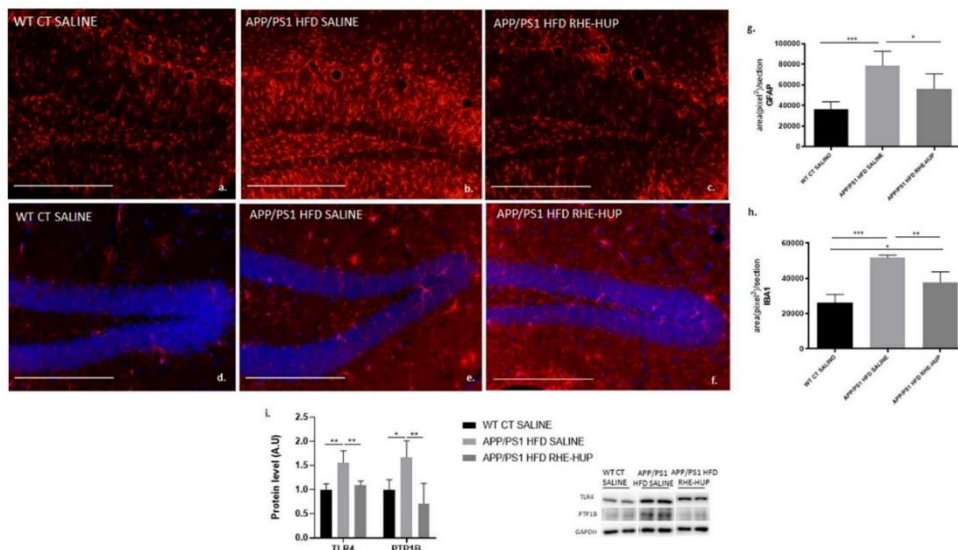


Fig. 5 Evaluation of inflammatory responses. Representative images for the detection of astrocytes **a–c**, and microglia **d–f**, co-stained with Hoechst for the detection of cellular nucleus (blue). Scale bar: 200 μ m. Graphic representation of fluorescence intensity quantification for GFAP **g** and IBA1 **h**. In both cases, statistical analysis was performed through one-way ANOVA ($n = 5$) and Tukey's post hoc test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. **i**, protein levels for TLR4 and PTP1B where two representative samples out of four or five per group are shown ($n = 4–5$). All results were represented as mean \pm SD. Groups were compared against each other using one-way ANOVA and Tukey post-test, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$

corroborated by the fluorescence intensity quantification data. A significant increase in astrogliosis and microglial activation in transgenic mice fed with HFD in comparison to the WT CT SALINE groups was found ($p < 0.001$). By contrast, this increase was significantly attenuated when these animals were treated with RHE-HUP (GFAP: APP/PS1 HFD SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.05$; IBA1: APP/PS1 HFD SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.01$) (Fig. 5 g–h).

Toll-like receptor 4 (TLR4) and protein tyrosine phosphatase (PTP1B), both related with neuroinflammation, were analyzed in the hippocampus. In agreement with glial profile, our results showed a similar pattern where concentrations of both proteins were significantly increased in the APP/PS1 HFD SALINE group compared to WT CT SALINE (TLR4: $p < 0.01$; PTP1B: $p < 0.05$), returning to baseline levels after treatment with RHE-HUP ($p < 0.01$, in both cases) (Fig. 5i).

RHE-HUP increases dendritic spines density and synaptic biomarkers in APP/PS1 HFD mice

The reduction in the number of dendritic spines together with alterations in cognition has been widely

demonstrated in AD patients, suggesting that they could play a key pathogenic role [51, 52]. Optical microscope images of the hippocampus are shown in Fig. 6a–c, accompanied by a representative magnification image of dendritic spines of each experimental group (Fig. 6d–f). A significant decrease in the number of dendritic spines was observed in APP/PS1 HFD SALINE when comparing with the control group (Fig. 6g–j), while in those animals treated with RHE-HUP, this reduction was reverted reaching levels similar to the control regardless of the studied area in the hippocampus (**DG TERMINAL:** WT CT SALINE vs APP/PS1 HFD SALINE $p < 0.001$; APP/PS1 HFD SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.05$. **DG RAMIFICATION:** WT CT SALINE vs APP/PS1 HFD SALINE $p < 0.0001$; APP/PS1 HFD SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.01$. **CA1 BASAL:** WT CT SALINE vs APP/PS1 HFD SALINE $p < 0.0001$; APP/PS1 HFD SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.001$. **CA1 APICAL:** WT CT SALINE vs APP/PS1 HFD SALINE $p < 0.001$; APP/PS1 HFD SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.01$).

Different synaptic proteins involved in memory process and plasticity, such as drebrin 1 (DBN1), synaptophysin

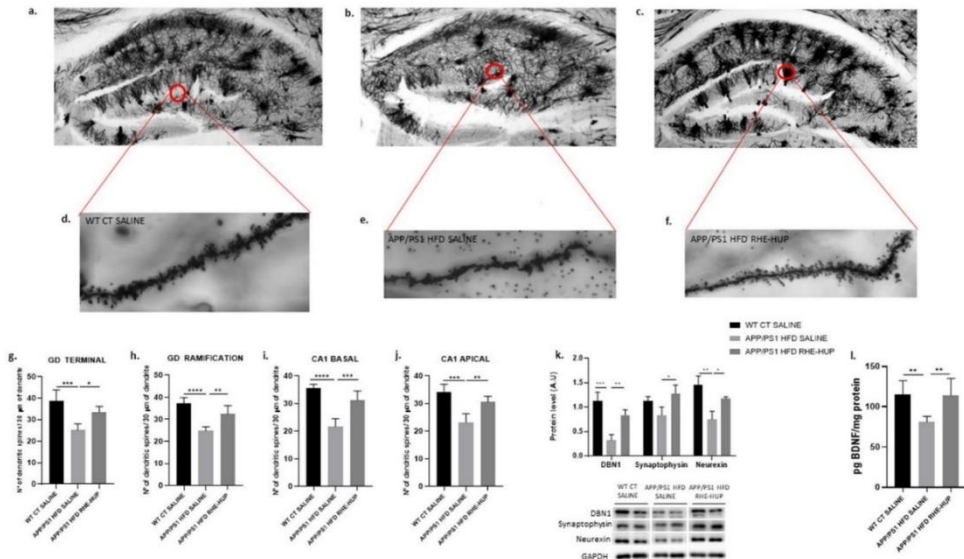


Fig. 6 Optical microscope images of the hippocampus **a–c** and representative magnification images of dendritic spines of each experimental group **d–e, g–j**. Quantification of dendritic spines of each 30 μm of dendrite in different areas of the hippocampus ($n = 5$). Groups were compared against each other using one-way ANOVA and Tukey post-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ **k**. Representative images of synaptic proteins levels were determined, where two representative samples out of four or five per group are shown ($n = 4–5$). Graphs bars represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey’s post-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. **l** Quantification of BDNF protein levels in the cortex ($n = 7$). Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey’s post-test, ** $p < 0.01$

and neurexin, were measured by Western Blot. Our results showed a significant decrease in DBN1 protein levels in the APP HFD SALINE group when they were compared with the control group ($p < 0.001$), while DBN1 levels were rescued after RHE-HUP administration ($p < 0.01$). A similar pattern was observed for the other synaptic proteins studied, but in the case of synaptophysin the values did not reach statistical significance, and only a positive trend was observed (Synaptophysin: APP/PS1 HFD SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $P < 0.05$; Neurexin: WT CT SALINE vs APP/PS1 HFD SALINE $p < 0.01$; APP/PS1 HFD SALINE vs APP/PS1 HFD RHE-HUP $p < 0.05$) (Fig. 6k).

Moreover, one protein that deserves special mention is BDNF plays a critical role not only in the growth and development of the nervous system, but also as a modulator of synaptic plasticity, suggesting that its regulation could play a key role in the preservation of cognitive function [53]. In this line and, in accordance with the results shown above, the analysis of BDNF levels in the cortex demonstrated a significant decrease in APP/PS1 HFD SALINE in comparison with WT CT SALINE ($p < 0.01$). Nevertheless, the treatment with RHE-HUP resulted in an increase of BDNF ($p < 0.01$) (Fig. 6l).

The treatment with RHE-HUP improves the cognitive process in APP/PS1 HFD mice

It has been described that one of the most important features of APP/PS1 mice is cognitive decline in terms of memory and spatial memory [54, 55]. To demonstrate the efficacy of RHE-HUP treatment in the recovery of cognitive decline, MWM and NORT tests were performed. Regarding MWM, APP/PS1 HFD SALINE mice showed an obviously more erratic trajectory, being unable to find the platform compared with WT CT SALINE mice. However, after RHE-HUP treatment, the trajectory of APP/PS1 HFD RHE-HUP tended to return to normality (Fig. 7a–c). In Fig. 7d, the escape latency of all groups throughout the training period is shown. The training performed by the different groups demonstrated an improvement of the learning ability in those animals treated with RHE-HUP in comparison to those treated with saline. In the same line, the results obtained on the test day showed a significant increase in escape latency in the APP/PS1 HFD SALINE when they were compared with control group ($p < 0.05$), effect which was reverted in those animals treated with the drug ($p < 0.05$) (Fig. 7e). Moreover, other parameters studied in the same test, such as the number of entries on the platform or the mean distance traveled to reach it, showed the same tendency toward improvement of cognitive function after RHE-HUP administration. Regarding the number of entries, the time of crossing through the target

platform was significantly reduced in non-treated animals ($p < 0.01$), whereas after treatment that number was recovered, reaching similar values to WT CT ($p < 0.01$) (Fig. 7f). In the case of the mean distance traveled to find the platform, non-treated animals swam a longer distance compared to the control group ($p < 0.05$), while after treatment, they reached the platform more easily ($p < 0.05$) (Fig. 7g). In agreement, in the NORT APP/PS1 HFD SALINE mice presented a decreased DI compared to the control group ($p < 0.001$), whereas the DI was recovered after treatment ($p < 0.001$), clearly indicating that RHE-HUP rescued mice from the memory deficit observed in this pathological model (Fig. 7h).

Discussion

AD is nowadays recognized as a multifactorial and heterogeneous disease in which metabolic alterations play an important role [56–58]. Previous work has shown that RHE-HUP improves the main hallmarks of AD in APP/PS1 mice [35]. However, the effect of RHE-HUP in an AD familial model of mice with a metabolic syndrome-like was not evaluated, yet. Our results demonstrated that RHE-HUP significantly reduces neuroinflammation, A β deposition and Tau phosphorylation, considered some of the main underlying disease mechanisms. Additionally, RHE-HUP treatment succeeded in increasing the levels of BDNF and other synapse-related proteins in the brain, which resulted in an increase in the number of dendritic spines, improving memory and learning. However, these changes were not associated with modifications in the metabolic peripheral parameters.

HFD consumption leads to metabolic alterations, including insulin resistance and T2DM [59, 60], both conditions frequently associated with the development of dementia [41, 61]. T2DM is a complex disorder that begins with a state of insulin resistance, leading to hyperinsulinemia and hyperglycemia, which is known to cause different alterations in the brain. Our study confirmed that HFD induces an increase in body weight, hyperglycemia and insulin resistance in APP/PS1 mice accompanied by the downregulation of IRS2 protein levels in the liver, a protein involved in insulin signaling regulation. However, the treatment with RHE-HUP did not reverse these effects, leading us to the conclusion that the observed benefits provided by RHE-HUP may not be due to a peripheral metabolic regulation, rather to a central effect. One of the possible answers could be that this molecule was designed to hit multiple targets involved in the pathogenesis of AD, i.e., to reach biological targets located at the central nervous system. Indeed, studies performed in *parallel artificial membrane permeability assays for blood-brain barrier* (PAMPA-BBB) clearly demonstrated that this compound was able to

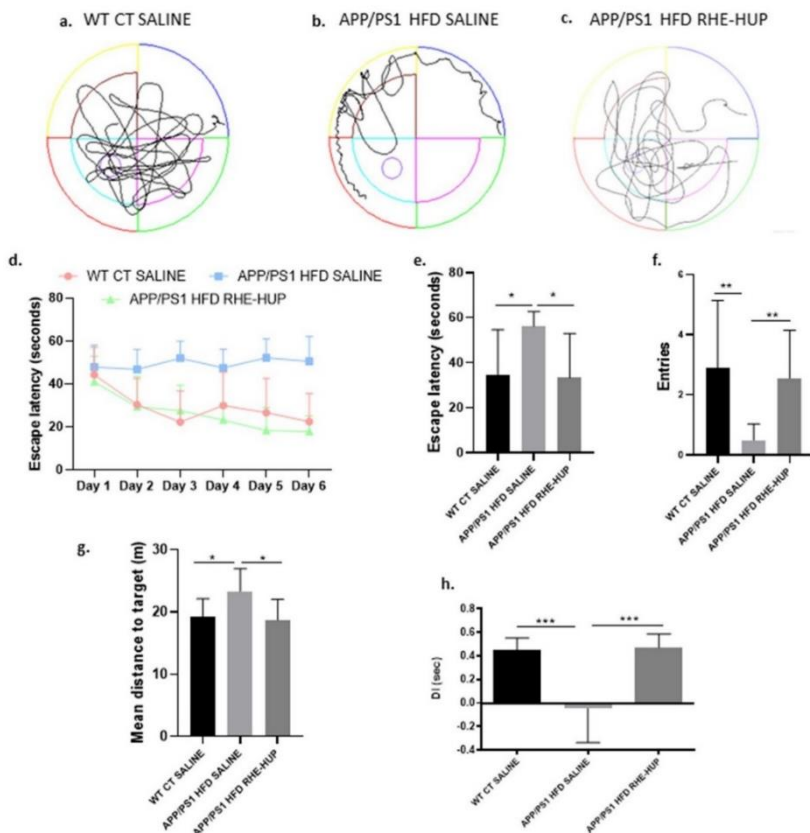


Fig. 7 a-c. Representative swim paths on the memory test. Learning curves of MWM during the spatial acquisition phase **d** and escape latency **e**, entries in platform **f** and mean distance traveled **g** on test day (n = 13). One-way ANOVA and Tukey's post-test were performed, except in the case of the analysis of entries in the platform where Krushal-Wallis was conducted. In all cases, * p < 0.05 and ** p < 0.01. **h**. NORI, Discrimination Index (DI) expressed in seconds (n = 13). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA and Tukey post-test, *** p < 0.001

enter the brain [34]. This fact was supported by the results obtained in previous studies where a reduction of A β levels and Tau phosphorylation leading to a memory amelioration, was observed after chronic administration of RHE-HUP to APPswe/PS-1dE9 mice [35]. Moreover, ex vivo [62–64] and in vivo biodistribution [65] studies with other hybrid compounds, closely related to RHE-HUP in terms of chemical structure and physicochemical properties, have demonstrated that this type of compounds readily enters the brain, some of them with more favorable brain/plasma ratio than the most prescribed anti-Alzheimer drug donepezil [65]. Very likely, this could be also the case for RHE-HUP, which might

account for its preferential central vs peripheral effects observed in this work using the familial AD mouse model, challenged by high-fat diet.

Brain insulin, apart from controlling energy metabolism, is also involved in other multiple functions including synaptogenesis, synaptic remodeling, and neurotransmitter level modulation. Thus, unbalanced insulin signaling, and metabolism may lead to cognitive decline and AD [66]. IRS2, a major component of the insulin/insulin-like growth factor-1 signaling pathway and a key factor in T2DM, also has a role in synaptic plasticity, learning and memory. A study carried out by Tanokashira and colleagues found that young adult C57BL/6 J

mice lacking IRS2 displayed hippocampus-associated behavioral alterations due to IRS2 deficiency-induced impairments of brain energy metabolism [67]. Our results agree with these data, since a IRS2 reduction was observed in the APP/PS1 HFD SALINE group recovering its levels after the RHE-HUP treatment. It has been also described that IRS2 signaling promotes the dephosphorylation of Tau, suggesting that failure on this pathway could lead to an hyperphosphorylation of Tau protein, considered one of the main early mechanisms of AD. Therefore, Tau phosphorylation might be a direct consequence of reduced insulin-IGF signaling during aging [47, 68]. Likewise, one of the main kinases responsible for Tau phosphorylation is GSK3 β [69]. The phosphorylation of this kinase in Tyr216 leads to its own activation which results not only in the increase in Tau phosphorylation levels [70], but also contributes to neuronal death independently of Tau [71]. In agreement with this, the present study demonstrated that RHE-HUP administration significantly reduced Tau phosphorylation, by IRS2 and p-GSK3 β regulation, which could explain the restoration of dendritic spine number and the resulting behavioral improvement observed in A PP/PS1 HFD mice after the treatment.

In addition to hyperphosphorylated Tau, another well-known hallmark of AD is the accumulation of β -amyloid deposits. Several studies have interconnected both processes defining A β plaques as the main triggers of Tau hyperphosphorylation and Tau tangle formation, as a result of an imbalance between A β production and A β clearance [14, 72]. In agreement with these previous data, we observed a significant reduction in the number of hippocampal and cortical A β plaques induced by RHE-HUP due to BACE1 inhibition. In turn, this correlated with the reduction of the levels of A β ₄₂, the most hydrophobic and aggregation-prone form of this peptide and, the predominant one in senile plaques [73, 74]. This event also explained the reduction in hyperphosphorylated Tau observed in this group.

As described by Pérez-Areales and coworkers, RHE-HUP seems to inhibit AChE [38], a prime target in AD, since the cholinergic deficit has been widely observed in AD patients and is directly responsible for the cognitive decline [75, 76]. However, the importance of this enzyme in the disease goes much further, since it has been described that it might bind to A β and promote its deposition [77], turning the combination of AChE + A β into more toxic to cells than A β alone [78].

Taking all this into account and according to our findings, the effect of RHE-HUP on decreasing the A β production and subsequent accumulation might be attributed to four main factors: (i) the inhibition of AChE, avoiding the interaction with A β and the consequent

formation of the toxic aggregates; (ii) the inhibition of the amyloidogenic pathway by decreasing hippocampal BACE1 activity; (iii) the direct reduction of APP protein levels and (iv) the activation of the non-amyloidogenic pathway by increasing ADAM10 levels [79–83]. In addition, our results show that RHE-HUP treatment increased IDE levels in the hippocampus, an enzyme that not only participates in A β elimination, but also plays a key role in insulin degradation, all together contributing to a reduction in A β deposition and cognitive improvement [84].

The glial activation in the brain is also an important pathological feature of neurodegenerative diseases, including AD [85–87]. Although early in the disease neuroinflammation may represent a protective response, an excessive reaction can cause or contribute to the pathology [88]. Several reports have described that the presence of A β and Tau hyperphosphorylation activate microglia and astrocytes [89–91], demonstrating that microglia can play dual roles in A β pathogenesis. Microglia may help to eliminate A β aggregation, and it may facilitate A β accumulation through the release of neurotoxic proteases and pro-inflammatory factors, which contribute to the neuroinflammation [92–96]. Thus, it generates a vicious circle in which A β plaques potentiate the release of inflammatory molecules and, at the same time, these molecules stimulate the formation and accumulation of A β [97, 98]. Moreover, it is well-known that the chronic consumption of HFD increases stress in different pathways including neuroinflammation [99], contributing to the development of cognitive impairment. In this line, Wiecekowska-Gacek et al. demonstrated that 4-months-old APP^{Swe} transgenic mice fed with western diet exhibited such brain neuroinflammation and accelerated amyloid pathology comparable to that induced by the administration of pro-inflammatory lipopolysaccharide (LPS). Hence, it highlighted the role that diet can play in neuroinflammation and, consequently, in AD [100]. In this sense, the observed decrease in the activation of microglia and astrocytes after RHE-HUP treatment might be due to the reduction in Tau phosphorylation and in A β deposition, but also to the improvement in the insulin signaling pathway at the central level observed upon treatment. Toll-like receptors play a pivotal role in brain injury and neurodegeneration, and, in CNS, they are mainly expressed in glial cells [101]. Specifically, the activation of TLR4 triggers the downstream stimulation of the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and the induction of genes that encode inflammation-associated molecules and cytokines, such as IL-6 and TNF- α [102, 103]. Furthermore, it has been demonstrated that TLR4 deficiency protects against ethanol-induced glial activation, induction of inflammatory

mediators, and apoptosis [101]. For this reason, the attenuation of the neuroinflammation observed after the RHE-HUP treatment could be related with the decrease of TLR4 levels, in agreement with previous studies which demonstrated that the treatment with resveratrol attenuated the increase in protein levels and the downstream activation of the pathway [104, 105].

In the same way, PTP1B also demonstrated a significant decrease in the RHE-HUP treated mice. Several studies have reported that the inhibition of PTP1B favors the inactivation of unfolded protein response (UPR) and neuroinflammation, thereby protecting against cognitive decline [106]. For this reason, PTP inhibitors have been suggested as a promising therapeutic modulation of microglial activation in neuroinflammatory diseases, including AD [107]. In addition, PTP1B not only has been related to this group of pathologies, but also represents a convergent point between AD and T2DM. In fact, preclinical studies have demonstrated that mice lacking PTP1B were resistant to weight gain and remained sensitive to insulin after HFD consumption [108, 109] suggesting that PTP1B downregulation could be key in order to improve the features observed in AD pathogenesis by the regulation of insulin signaling pathway and neuroinflammatory processes [110].

Moreover, in a pathological environment the released cytokines and chemokines contribute to an excessive pruning of synaptic terminals causing synaptic dysfunction and neuronal loss [111]. In fact, another important pathway in which PTP1B is involved is the BDNF/TrkB pathway [112]: PTP1B down-regulates neuronal BDNF-TrkB pathway, whereas the PTP1B inhibition stimulates BDNF signaling [113, 114]. Considering that preclinical studies suggest that the increase in BDNF levels is a suitable strategy to enhance the cognitive process [115], the decrease in PTP1B levels induced by RHE-HUP treatment observed in our results and the consequent increase in BDNF levels could explain the recovery in dendritic spines number caused by the treatment. In addition, dendritic spines loss is also related with A β and Tau pathology, since a study performed by Bittner et al., demonstrated that mice coexpressing mutant APP, PS1 and Tau, presented a strong loss of dendritic spines with accumulation of hyperphosphorylated Tau protein as well as soluble A β [116]. Therefore, the reduction already discussed in A β accumulation and Tau hyperphosphorylation caused by the treatment might also be contributing to the recovery of dendritic spines. These results were also accompanied by an increase in DBN1 levels. DBN1 is typically located in postsynaptic regions of excitatory synapses, and it is responsible for controlling

spine function and morphology [117, 118]. Its preservation has been related to neuroprotection, and, by contrast, its reduction in the hippocampus has been linked to cognitive deficits [119, 120]. Thus, our data confirm that the increase in DBN1 could be associated with the improvement observed in cognitive functioning. In the same way, synaptophysin and neurexin showed a similar profile. Synaptophysin is a glycoprotein present in synaptic vesicles which is related to synaptic plasticity. Thus, a decrease in its levels has been related to cognitive impairment [121]. At the same time, neurexin downregulation has also been associated with cognitive impairments since it has been found to be active in synapse maturation and adaptation of synaptic strength [122]. In addition, it has been demonstrated that A β ₄₂ oligomers bind to neurexin, and this interaction leads to a decrease in its expression, inducing synapse pathology [123]. This would explain the increase in neurexin protein levels produced by the decrease in A β ₄₂ levels observed after treatment with RHE-HUP.

Recent postmortem studies in people with AD have shown that the number of dendritic spines is lower in patients with clinically evident AD compared to controls, and similar between control subjects and subjects that are cognitively normal but present the underlying biological features of AD. Thus, these observations provide cellular evidence supporting the hypothesis that dendritic spine plasticity provides a mechanism of cognitive resilience that protects people with an early stage of dementia from developing AD [124, 125]. In fact, numerous preclinical studies have related the loss of dendritic spines with hippocampus-dependent learning and memory ability impairments [126–128]. In the present study, RHE-HUP treatment induced the recovery in the number of dendritic spines, which was accompanied by an improvement in hippocampal-dependent recognition memory assessed by NORT, as well as spatial and learning memory evaluated by MWM.

In conclusion, the present study demonstrates that the multi-target compound RHE-HUP restores the number of dendritic spines and enhances cognition in APP/PS1 mice, whose pathology is exacerbated with HFD consumption, by regulation of brain insulin signaling and neuroinflammation, which contributes to the reduction of hyperphosphorylated Tau and A β levels (Fig. 8). However, we did not observe peripheral metabolic regulation induced by the drug administration, suggesting that the improvement observed in our model is exclusively due to a regulation at central level. These results support RHE-HUP as a new promising molecule for the treatment of AD, also in those individuals with metabolic disturbances.

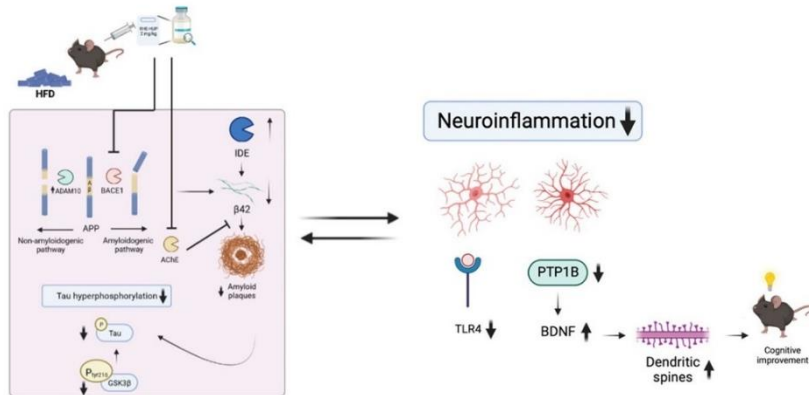


Fig. 8 Schematic representation of the effects of RHE-HUP treatment in APP/PS1 mice fed with HFD. The figure shows the pathological mechanisms targeted by RHE-HUP that could explain the improvement in cognition observed in this double pathological model

Abbreviations

- Aa Amino acids
- Aβ Amyloid-beta
- AChE Acetylcholinesterase
- AD Alzheimer's disease
- APP Amyloid precursor protein
- APP-CTF APP-C-terminal fragment
- BACE1 β-Secretase
- BDNF Brain derived neurotrophic factor
- DBN1 Drebrin 1
- DG Dentate gyrus
- DI Discrimination index
- GFAP Glial fibrillary acidic protein
- (p)-GSK3β (Phospho)-Glycogen synthase kinase-3β
- GTT Glucose tolerance test
- HFD High-fat diet
- IBA1 Ionized calcium-binding adapter molecule 1
- IDE Insulin-degrading enzyme
- IRS2 Insulin receptor substrate protein 2
- ITT Insulin tolerance test
- LPS Lipopolysaccharide
- LTP Long-term potentiation
- MWM Morris water maze
- NFκB Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- NFTs Neurofibrillary tangles
- NORT Novel object recognition test
- PB Phosphate buffer
- PBS Phosphate-buffered saline
- PTP1B Protein tyrosine phosphatase
- RHE-HUP Rhein-huprine
- sAPPβ Soluble amyloid precursor protein β fragment
- SD Standard deviation
- TLR4 Toll-like receptor 4
- T2DM Type 2 diabetes mellitus
- UPR Unfolded protein response
- WT Wild-type

Acknowledgements

Not applicable.

Author contributions

Conducted the research: TEJ, AC, KP, DMT, AP, EV. Designed the research and coordinated the study: ACE, ME, EV, CA, JO, AC. Conducted the statistical

analysis: TEJ. Drafted the paper: TEJ, AC, ESL, JO, JF, MB, EV, CA, DMT, ACE, ME. Funding acquisition: AC, ESL, MB, CA, DMT, ACE, ME. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2017-84283-R, PID2020-118127RB-I00, PID2021-122473OA-I00, PID2021-122187NB-C32, PID2021-123462OB-I00), the Fondo de Investigación Sanitaria (PI19/00854) and co founded by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), the Centre for Network Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases CB06/05/0024) and the Generalitat de Catalunya (2014SGR-525). This research was partially funded by PRIME/H2020-SCI-BHC-2018-2020, Ref: 847879) and Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia María de Maeztu (CEX2021-001159-M), Universidad de Barcelona, UBNEURO Instituto de neurociencias. AC is a recipient of the Instituto de Salud Carlos III Sara Borrell fellowship (grant CD22/00125). ESL is supported by the Requalification of the Spanish University System Program. JO and ME are Serra Hünter fellows.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

All the experiments on APP/PS1 transgenic mice were performed in accordance with the European Community Council Directive 86/609/EEC and the procedures were established by the Department d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of the Generalitat de Catalunya.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

¹Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Science, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ²Institute of Neuroscience, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ³Biomedical Research Networking Centre in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain. ⁴Department of Pharmacy, Pharmaceutical

Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁵Ace Alzheimer Center Barcelona—International University of Catalunya (UIC), Barcelona, Spain. ⁶Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁷Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides, IQAC-CSIC, 08034 Barcelona, Spain. ⁸Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁹Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, Universidad Autónoma de Chile, Talca, Chile. ¹⁰Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), 43201 Reus, Spain. ¹¹Nutrition and Metabolic Health Research Group, Institute of Health Pere Virgili—IISPV, 43201 Reus, Spain. ¹²CIBER Physiology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Carlos III Health Institute, 28029 Madrid, Spain. ¹³Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ¹⁴Laboratory of Medicinal Chemistry (CSIC Associated Unit), Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ¹⁵Institute of Biomedicine (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ¹⁶Department of Basic Sciences, Universitat Internacional de Catalunya (UIC), Sant Cugat del Valles, Spain. ¹⁷Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII 27/31, 08028 Barcelona, Spain.

Received: 29 December 2022 Accepted: 28 February 2023

Published online: 09 March 2023

References

- Forstl H, Burns A, Levy R, Cairns N, Luthert P, Lantos P. Neuropathological correlates of behavioural disturbance in confirmed Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry*. 1993;163(3):364–8.
- Jahn H. Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2022;15(4):445–54.
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salway S, et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2016;388(10043):505–17.
- Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurosci*. 2011;10(9):819–28.
- Gauthier S, Panisset M, Nalbantoglu J, Poirier J. Alzheimer's disease: current knowledge, management and research. *CMAJ*. 1997;157:8.
- Wegmann S, Biernat J, Mandelkow E. A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2021;69:131–8.
- Rahman MM, Lendel C. Extracellular protein components of amyloid plaques and their roles in Alzheimer's disease pathology. *Mol Neurodegener*. 2021;16(1):1–30.
- Wilson CA, Doms RW, Lee VMY. Intracellular APP processing and A β production in Alzheimer disease. *J Neurobiol*. 1999;58(8):787–94.
- Guo JP, Arai T, Miklosy J, McGeer PL. A β and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms in Alzheimer's diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(6):1953–8.
- Takashima A. GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2006;9(s3):309–17.
- Stoothoff WH, Johnson GVW. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1739(2–3):280–97.
- Reddy PH. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2011;1415:136–48.
- Vaquero-Alicea J, Diamond MI, Joachim IA. Tau strains shape disease. *Acta Neuropathol*. 2021;142(1):57–71.
- Alvarez G, Muñoz-Montañón JR, Sotrústegui J, Avila J, Bogónez E, Díaz-Nido J. Regulation of tau phosphorylation and protection against β -amyloid-induced neurodegeneration by lithium possible implications for Alzheimer's disease. *Bipolar Disord*. 2002;4(3):153–65.
- Inestrosa NC, Sagal JP, Colombres M. Acetylcholinesterase interaction with Alzheimer amyloid beta. *Subcell Biochem*. 2005;38:299–317.
- García-Ayllón MS, Small DH, Avila J, Sáez-Valero J. Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: cross-talk with β -tau and p-amyloid. *Front Mol Neurosci*. 2011. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00022>.
- Mesulam M. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem*. 2004;11(1):43–9.
- Bachurin SO, Bovina EV, Ustyugov AA. Drugs in clinical trials for Alzheimer's disease: the major trends. *Med Res Rev*. 2017;37(5):1186–225.
- de Paula JRV, Guimarães FM, Diniz BS, Forlenza OV. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: amyloid-beta, TAU protein or both? *Dement Neuropsychol*. 2009;3(3):188–94.
- González A, Califo C, Churrua M, Maccioni RB. Glucose metabolism and AD: evidence for a potential diabetes type 3. *Alzheimer Res Ther*. 2022;14(1):1–11.
- Rao AA, Sridhar GR, Das UN. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*. 2007;69(6):1272–6.
- Vieira MNN, Lima-Filho RAS, de Felice FG. Connecting Alzheimer's disease to diabetes: underlying mechanisms and potential therapeutic targets. *Neuropharmacology*. 2018;136:160–71.
- Awad N, Gagnon M, Messier C. The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2010;26(8):1044–80.
- Nooyens ACJ, Baan CA, Spijkerman AMW, Monique Verschuren WM. Type 2 diabetes and cognitive decline in middle-aged men and women: the doetinchem cohort study. *Diabetes Care*. 2010;33(9):1964–9.
- Luchsinger JA. Type 2 diabetes and cognitive impairment: linking mechanisms. *J Alzheimer's Dis*. 2012;30(s2):S185–98.
- de La Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes—evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol*. 2008;2(6):1101–13.
- de La Monte SM, Tong M, Lester-Coli N, Plater M, Wands JR. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2006;10(1):89–109.
- Kroner Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: type 3 diabetes. *Altern Med Rev*. 2009;14(4):373–9.
- Wolf PA, Beiser A, Elias MF, Au R, Vasán RS, Seshadri S. Relation of obesity to cognitive function: importance of central obesity and synergistic influence of concomitant hypertension the framingham heart study. *Curr Alzheimer Res*. 2007;4(2):111–6.
- Taylor HA, Przemyska L, Clavane EM, Meakin PJ. BACE1: more than just a β -secretase. *Obes Rev*. 2022;23(7):e13430.
- Dekeryte R, Franklin Z, Hull C, Croce L, Kamil-Salino S, Helk O, et al. The BACE1 inhibitor LY2886721 improves diabetic phenotypes of BACE1 knock-in mice. *Biochim Biophys Acta*. 2021;1867(7):166149.
- Plucińska K, Dekeryte R, Koss D, Shearer K, Mody N, Whitfield PD, et al. Neuronal human BACE1 knockin induces systemic diabetes in mice. *Diabetologia*. 2016;59(7):1513–23.
- Muñoz-Torrero D. Multitarget anti-Alzheimer hybrid compounds do they work in vivo? design of hybrid molecules for drug development. Amsterdam: Elsevier; 2017.
- Viayna E, Sola I, Bartolini M, de Simone A, Tapia-Rojas C, Serrano FG, et al. Synthesis and multitarget biological profiling of a novel family of rhelin derivatives as disease-modifying anti-Alzheimer agents. *J Med Chem*. 2014;57(6):2549–67.
- Serrano FG, Tapia-Rojas C, Carvajal FJ, Cisternas P, Viayna E, Sola I, et al. Rheim-huprine derivatives reduce cognitive impairment, synaptic failure and amyloid pathology in ABPPsw/PS-1 mice of different ages. *Curr Alzheimer's Res*. 2016;13(9):1017–29.
- Jiao SS, le Bu X, Liu YH, Zhu C, Wang QH, Shen LL, et al. Sex dimorphism profile of Alzheimer's disease-type pathologies in an APP/PS1 mouse model. *Neurotox Res*. 2015;29(2):256–66.
- Wang J, Tanila H, Puolivali J, Kadish I, van Groen T. Gender differences in the amount and deposition of amyloid β in APPsw and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2003;14(3):318–27.
- Pérez-Areales FJ, Betari N, Viayna A, Pont C, Espargaró A, Bartolini M, et al. Design, synthesis and multitarget biological profiling of second-generation anti-Alzheimer rhelin-huprine hybrids. *Future Med Chem*. 2017;9(10):965–81.
- Ettcheto M, Sánchez-López E, Gómez-Minguez Y, Cabrera H, Busquets O, Beas-Zarate C, et al. Peripheral and central effects of memantine in a mixed preclinical mice model of obesity and familial Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2018;55(9):7327–39.

40. Ettcheto M, Petrov D, Pedros I, Alva N, Carbonell T, Beas-Zarate C, et al. Evaluation of neuropathological effects of a high-fat diet in a presymptomatic Alzheimer's disease stage in APP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis*. 2016;54(1):233–51.
41. Petrov D, Pedrós I, Artiach G, Sureda FX, Barroso E, Pallàs M, et al. High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(9):1687–99.
42. Busquets O, Ettcheto M, Pallàs M, Beas-Zarate C, Verdaguier E, Auladell C, et al. Long-term exposition to a high fat diet favors the appearance of β -amyloid depositions in the brain of C57BL/6J mice a potential model of sporadic Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2017;162:38–45.
43. Yang Y, Smith DL, Keating KD, Allison DB, Nagy TR. Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J mice. *Obesity*. 2014;22(10):2147–55.
44. Avtanski D, Pavlov VA, Tracey KJ, Poretzky L. Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. *Animal Model Exp Med*. 2019;2(4):252–8.
45. Gabbouj S, Ryhänen S, Marttinen M, Wittrahm R, Takalo M, Kemppainen S, et al. Altered insulin signaling in Alzheimer's disease brain-special emphasis on pi3k-akt pathway. *Front Neurosci*. 2019. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00629>.
46. Bedde G, di Domenico F, Serviddio G, Cassano T. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge. *Front Neurosci*. 2015;9(MAY):204.
47. Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, et al. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes Tau phosphorylation. *J Neurosci*. 2003;23(18):7084–92.
48. Kurochkin IV, Goto S. Alzheimer's β -amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett*. 1994;345(1):33–7.
49. Hoozemans JJM, Rozemuller AJM, van Haastert ES, Eikelenboom P, van Gool WA. Neuroinflammation in Alzheimer's disease wanes with age. *J Neuroinflamm*. 2011;8(1):1–8.
50. Morales J, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Fariás GA, Maccioni RB. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease a rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci*. 2014;8(1):112.
51. Boros BD, Greathouse KM, Gentry EG, Curtis KA, Birchall EL, Gearing M, et al. Dendritic spines provide cognitive resilience against Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2017;82(4):602–14.
52. Knobloch M, Mansuy IM. Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2008;37(1):73–82.
53. Li Y, Li F, Qin D, Chen H, Wang J, Wang J, et al. The role of brain derived neurotrophic factor in central nervous system. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:1065.
54. Puolivali J, Wang J, Heikkinen T, Heikkilä M, Tapiola T, van Groen T, et al. Hippocampal A β 42 levels correlate with spatial memory deficit in APP and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2002;9(3):339–47.
55. Su D, Zhao Y, Xu H, Wang B, Chen X, Chen J, et al. Isoflurane exposure during mid-adulthood attenuates age-related spatial memory impairment in APP/PS1 transgenic mice. *PLoS ONE*. 2012;7(11):e50172.
56. Gong CX, Liu F, Iqbal K. Multifactorial hypothesis and multi-targets for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2018;64(s1):S107–17.
57. Carmo Carreiras M, Mendes E, Jesus Perry M, Paula Francisco A, Marco-Contelles J. The multifactorial nature of Alzheimer's disease for developing potential therapeutics. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(15):1745–70.
58. Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies. *Alzheimers Dement*. 2010;6(5):420–4.
59. An Y, Xu W, Li H, Lei H, Zhang L, Hao F, et al. High-fat diet induces dynamic metabolic alterations in multiple biological matrices of rats. *J Proteome Res*. 2013;12(8):3755–68.
60. Nesci V, Russo E, Arcidiacono B, Citraro R, Tallarico M, Constanti A, et al. Metabolic alterations predispose to seizure development in high-fat diet-treated mice: the role of metformin. *Mol Neurobiol*. 2020;57(11):4778–89.
61. Kang S, Lee YH, Lee JE. Metabolism-centric overview of the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Yonsei Med J*. 2017;58(3):479–88.
62. Galdeano C, Viayna E, Sola I, Formosa X, Camps P, Badia A, et al. Huprine-tacrine heterodimers as anti-amyloidogenic compounds of potential interest against Alzheimer's and prion diseases. *J Med Chem*. 2012;55(2):661–9.
63. Sola I, Aso E, Frattini D, López-González I, Espargaró A, Sabaté R, et al. Novel levitracetam derivatives that are effective against the Alzheimer-like phenotype in mice: synthesis, in vitro, ex vivo, and in vivo efficacy studies. *J Med Chem*. 2015;58(15):6018–32.
64. Sola I, Viayna E, Gómez T, Galdeano C, Cassina M, Camps P, et al. Multigram synthesis and in vivo efficacy studies of a novel multitarget anti-Alzheimer's compound. *Molecules*. 2015;20(3):4492–515.
65. Viayna E, Coquelle N, Cieslikiewicz-Bouet M, Cisternas P, Oliva CA, Sánchez-López E, et al. Discovery of a potent dual inhibitor of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with antioxidant activity that alleviates Alzheimer-like pathology in old APP/PS1 mice. *J Med Chem*. 2020;64(1):812–39.
66. Craft S, Cholerton B, Baker LD. Insulin and Alzheimer's disease: untangling the web. *J Alzheimers Dis*. 2013;33(s1):S263–75.
67. Tanokashira D, Wang W, Maruyama M, Kuroiwa C, White MF, Taguchi A. Irs2 deficiency alters hippocampus-associated behaviors during young adulthood. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;559:148–54.
68. Ochial T, Sano T, Nagayama T, Kubota N, Kadowaki T, Wakabayashi T, et al. Differential involvement of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in brain insulin signaling is associated with the effects on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2021;159:105510.
69. Anderton BH, Betts J, Blackstock WP, Brion JP, Chapman S, Connell J, et al. Sites of phosphorylation in tau and factors affecting their regulation. *Biochem Soc Symp*. 2001;67:73–80.
70. Das TK, Jana P, Chakrabarti SK, Abdul Hamid MRW. Curcumin down-regulates GSK3 and Cdk5 in scopolamine-induced alzheimer's disease rats abrogating A β 40/42 and Tau hyperphosphorylation. *J Alzheimers Dis Rep*. 2019;3(1):257–67.
71. Toral-Rios D, Pichardo-Rojas PS, Alonso-Vanegas M, Campos-Peña V. GSK3 β and Tau protein in Alzheimer's disease and epilepsy. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:19.
72. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297(5580):353–6.
73. Klein AM, Kowall NW, Ferrante RJ. Neurotoxicity and oxidative damage of beta amyloid 1–42 versus beta amyloid 1–40 in the mouse cerebral cortex. *Ann NY Acad Sci*. 1999;893:314–20.
74. Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res*. 2001;32(5):367–81.
75. Minger SL, Esiri MM, McDonald B, Keene J, Carter J, Hope T, et al. Cholinergic deficits contribute to behavioral disturbance in patients with dementia. *Neurology*. 2000;55(10):1460–7.
76. Mega MS. The cholinergic deficit in Alzheimer's disease: impact on cognition, behavior and function. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2000;3(2):S3–12.
77. Geula C, Greenberg BD, Mesulam MM. Cholinesterase activity in the plaques, tangles and angioathy of Alzheimer's disease does not emanate from amyloid. *Brain Res*. 1994;644(2):327–30.
78. Alvarez A, Opazo C, Alarcón R, Garrido J, Inestrosa NC. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid- β -peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J Mol Biol*. 1997;272(3):348–61.
79. Bandyopadhyay S, Goldstein LE, Lahiri DK, Rogers JT. Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting β -secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*. 2007;14(27):2848–64.
80. Coimbra JRM, Marques DFF, Baptista SJ, Pereira CMF, Moreira PI, Dinis TCP, et al. Highlights in BACE1 inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Front Chem*. 2018;6(MAY):178.
81. Espeseth AS, Xu M, Huang Q, Coburn CA, Jones KLG, Ferrer M, et al. Compounds that bind APP and inhibit A β processing in vitro suggest a novel approach to Alzheimer disease therapeutics. *J Biol Chem*. 2005;280(18):17792–7.
82. Farkhondeh T, Forouzanfar F, Roshanravan B, Samarghandian S. Curcumin effect on non-amyloidogenic pathway for preventing Alzheimer's disease. *Biointerface Res Appl Chem*. 2019;9(4):4085–9.

83. Guo T, Hobbs DW. Development of BACE1 inhibitors for Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*. 2006;13(15):1811–29.
84. Pivovarova O, Hohn A, Grune T, Pfeiffer AFH, Rudovich N. Insulin-degrading enzyme: new therapeutic target for diabetes and Alzheimer's disease? *Ann Med*. 2016;48(8):614–24.
85. Zhang F, Jiang L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015;11:243.
86. Hong H, Kim BS, Im HI. Pathophysiological role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Int Neuro-urol J*. 2016;20(Suppl 1):52.
87. Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (review). *Mol Med Rep*. 2016;13(4):3391–6.
88. Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2012;16(25):2766–78.
89. Verri M, Pastoris O, Dossena M, Aquilani R, Guerriero F, Cuzzoni G, et al. Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012;25(2):345–53.
90. Metcalfe MJ, Figueiredo-Pereira ME. Relationship between Tau pathology and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*. 2010;77(1):50–8.
91. Ismail R, Parbo P, Madsen LS, Hansen AK, Hansen KV, Schaldemose JL, et al. The relationships between neuroinflammation, beta-amyloid and tau deposition in Alzheimer's disease: a longitudinal PET study. *J Neuroinflamm*. 2020;17(1):1–11.
92. Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, van Eldik LJ. Amyloid- β peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res*. 1998;785(2):195–206.
93. Szczepaniak AM, Ringheim GE. IL-10 and glucocorticoids inhibit A β (1–42)- and lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine induction in the central nervous system. *J Alzheimers Dis*. 2003;5(2):105–17.
94. Grathwohl SA, Kálin RE, Bolmont T, Prokop S, Winkelmann G, Kaeser SA, et al. Formation and maintenance of Alzheimer's disease β -amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat Neurosci*. 2009;12(11):1361–3.
95. LeBlanc AC, Xue R, Gambetti P. Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia. *J Neurochem*. 1996;66(6):2300–10.
96. Majumdar A, Capetillo-Zarate E, Cruz D, Gouras GK, Maxfield FR. Degradation of Alzheimer's amyloid fibrils by microglia requires delivery of CIC-7 to lysosomes. *Mol Biol Cell*. 2011;22(10):1664–76.
97. Cai Z, Zhao B, Ratka A. Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *NeuroMol Med*. 2011;13(4):223–50.
98. Yana MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*. 2013;62:90–101.
99. Reilly AM, Tsai AP, Lin PB, Ericsson AC, Oblak AL, Ren H. Metabolic defects caused by high-fat diet modify disease risk through inflammatory and amyloidogenic pathways in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutrients*. 2020;12(10):2977.
100. Więckowska-Gacek A, Mielęska-Porowska A, Chutorński D, Wydrych M, Długosz J, Wojda U. Western diet induces impairment of liver-brain axis accelerating. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:136.
101. Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci*. 2010;30(24):8285–95.
102. Rahimifard M, Maqbool F, Moeini-Nodeh S, Niaz K, Abdollahi M, Braidji N, et al. Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: a novel therapeutic strategy for neuroinflammation. *Ageing Res Rev*. 2017;36:11–9.
103. Yang Y, Wu J, Wang J. Original article a database and functional annotation of NF- κ B target genes. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(5):7986–95.
104. Azimi H, Khakshur AA, Abdollahi M, Rahimi R. Potential new pharmacological agents derived from medicinal plants for the treatment of pancreatic cancer. *Pancreas*. 2015;44(1):11–5.
105. Zhang Z, Chen N, Liu JB, Wu JB, Zhang J, Zhang Y, et al. Protective effect of resveratrol against acute lung injury induced by lipopolysaccharide via inhibiting the myd88-dependent Toll-like receptor 4 signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2014;10(1):101–6.
106. Liu B, Ou G, Chen Y, Zhang J. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B protects against sevoflurane-induced neurotoxicity mediated by ER stress in developing brain. *Brain Res Bull*. 2019;146:28–39.
107. Song GJ, Kim J, Kim JH, Song S, Park H, Zhang ZY, et al. Comparative analysis of protein tyrosine phosphatases regulating microglial activation. *Exp Neurobiol*. 2016;25(5):252.
108. Elchebly M, Payette P, Michalyszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*. 1999;283(5407):1544–8.
109. Klamn LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2000;20(15):5479–89.
110. Nakandakari SCBR, Muñoz VR, Kuga GK, Gaspar RC, Sant'Ana MR, Pavan ICB, et al. Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain Behav Immun*. 2019;79:284–93.
111. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*. 2016;139:136–53.
112. Vieira MNN, Lyra Silva NME, Ferreira ST, de Felice FG. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): a potential target for Alzheimer's therapy? *Front Aging Neurosci*. 2017. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00007>.
113. Krishnan N, Krishnan K, Connors CR, Choy MS, Page R, Peti W, et al. PTP1B inhibition suggests a therapeutic strategy for Rett syndrome. *J Clin Invest*. 2015;125(8):3163–77.
114. Ozek C, Kanoski SE, Zhang ZY, Grill HJ, Bence KK. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is a novel regulator of central brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin receptor kinase B (TrkB) signaling. *J Biol Chem*. 2014;289(46):31682–92.
115. Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, Bekinschtein P. Brain-derived neurotrophic factor: a key molecule for memory in the healthy and the pathological brain. *Front Cell Neurosci*. 2019. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00363>.
116. Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S, Ochs SM, Hoffmann N, Mitteregger G, et al. Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PLoS ONE*. 2010;5(11):e15477.
117. Hayashi K, Ishikawa R, Ye LH, He XL, Takata K, Kohama K, et al. Modulatory role of drebrin on the cytoskeleton within dendritic spines in the rat cerebral cortex. *J Neurosci*. 1996;16(22):7161–70.
118. Sekino Y, Kojima N, Shiro T. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem Int*. 2007;51(2–4):92–104.
119. Counts SE, He B, Nadeem M, Wu J, Scheff SW, Mufson EJ. Hippocampal drebrin loss in mild cognitive impairment. *Neurodegener Dis*. 2012;10(1–4):216–9.
120. Harigaya Y, Shoji M, Shiro T, Hirai S. Disappearance of actin-binding protein, drebrin, from hippocampal synapses in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 1996;43(1):87–92.
121. Zhang X, Shen X, Dong J, Liu WC, Song M, Sun Y, et al. Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate ameliorates learning and memory impairment through upregulating CRTCI and synaptophysin in ischemic stroke rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2019;39(8):1151–63.
122. Knight D, Xie W, Boulianne GL. Neurexins and neuroligins: recent insights from invertebrates. *Mol Neurobiol*. 2011;44(3):426.
123. Naito Y, Tanabe Y, Lee AK, Hamel E, Takahashi H. Amyloid- β oligomers interact with neurexin and diminish neurexin-mediated excitatory presynaptic organization. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–13.
124. Walker CK, Herskowitz JH. Dendritic spines: mediators of cognitive resilience in aging and Alzheimer's disease. *Neuroscientist*. 2020;27(5):487–505.
125. Herms J, Dorostkar MM, Landsteiner K. Dendritic spine pathology in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pathol*. 2016;11(1):221–50.
126. Cao Z, Yang X, Zhang H, Wang H, Huang W, Xu F, et al. Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat. *Chemosphere*. 2016;151:289–95.
127. Chabrier MA, Cheng D, Castello NA, Green KN, LaFeria FM. Synergistic effects of amyloid-beta and wild-type human tau on dendritic spine loss in a floxed double transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2014;64:107–17.

128. Kandimalla R, Manczak M, Yin X, Wang R, Reddy PH. Hippocampal phosphorylated Tau induced cognitive decline, dendritic spine loss and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2018;27(1):30–40.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



DISCUSIÓN

Más de 45 millones de personas en todo el mundo padecen EA, un déficit u otras alteraciones cognitivas que pueden conducir a la muerte entre tres y nueve años después del diagnóstico. El principal factor de riesgo de esta enfermedad es la edad, por lo que a medida que la población envejezca, la prevalencia se acercará a los cerca de 131 millones de casos a nivel mundial para 2050. Por lo tanto, la EA es una enfermedad que representa un problema de carácter global, convirtiéndose en una epidemia de rápido crecimiento y simbolizando una gran amenaza para la salud pública en nuestras sociedades (K. V. Nguyen, 2018).

Evidencia creciente sugiere que la obesidad y la diabetes, combinadas con la edad, contribuyen a la susceptibilidad de padecer EA, mostrando así una posible relación entre las alteraciones metabólicas y las cognitivas. Al mismo tiempo, una dieta rica en grasa se ha relacionado con un aumento de la obesidad y, consecuentemente, un aumento del riesgo de padecer DMT2 (Pugazhenti et al., 2017). Pero, a pesar de esta relación, las vías que conectan todas estas condiciones no se han esclarecido completamente. Esto deja patente la necesidad de llevar más allá la investigación de posibles mecanismos que relacionen las alteraciones metabólicas y las cognitivas, pudiendo representar potenciales dianas terapéuticas para su tratamiento y prevención. En este sentido, actualmente no se conocen tratamientos que hayan sido capaces de frenar y/o curar la EA. Una de las posibles causas que se han propuesto para explicar esta falta de eficacia es que, cuando se comienza a tratar, ya es demasiado tarde y la enfermedad ha avanzado y deteriorado significativamente las estructuras cerebrales. Por ello, esta tesis ha estado parcialmente centrada en el estudio de una nueva diana, que relaciona un factor de riesgo como son las alteraciones metabólicas con el déficit cognitivo, pudiendo ayudar a frenar el desarrollo de la EA en las fases previas a su aparición.

Como se ha podido ver en la introducción de esta tesis, la EA es una enfermedad de carácter multifactorial. Hasta ahora, la hipótesis de la cascada amiloide, como uno de los primeros eventos que desencadenan la enfermedad, ha dominado el campo (Bayer & Wirths, 2014; Selkoe & Hardy, 2016). Sin embargo, debido a la falta de eficacia de los tratamientos que tienen como diana componentes de esta hipótesis, así como estudios que demuestran que los niveles de A β no se correlacionan con el grado de déficit cognitivo de los pacientes, se está entrando en una nueva era. En ella, la visión de la EA como una única vía patológica secuencial, con la hipótesis amiloidogénica como único evento causal inicial, está siendo sustituida por un cuadro mucho más complejo. En este cuadro, la EA es considerada una patología multifactorial en la que subyacen varios procesos patológicos parcialmente independientes (Samanta et al., 2022). Por este motivo, otra explicación de por qué los tratamientos actuales no han conseguido detener el avance de esta enfermedad podría ser el hecho de que van dirigidos contra una sola de las múltiples dianas que participan en su desarrollo. Es por ello que esta tesis doctoral también se ha centrado en el estudio del fármaco RHE-HUP, una molécula multidiana, apostando por esta nueva, prometedora y más realista vía para hacer frente a la EA.

Los resultados de la presente tesis doctoral se discuten a continuación.

Estudio del papel del receptor PPAR β/δ en el desarrollo de alteraciones cognitivas

En este apartado de la discusión se muestran interesantes hallazgos sobre el papel neurológico del receptor PPAR β/δ en ratones alimentados con una dieta convencional o con una dieta rica en grasa. Usando ratones PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ y sus controles WT, se evaluó el impacto de la falta de este receptor nuclear en la densidad de espinas dendríticas, marcadores sinápticos y en la función cognitiva, y si un factor de riesgo como es la alimentación con una dieta rica en grasa sería capaz de deteriorar este ya estado patológico. Según este estudio, este receptor juega un papel importante en el mantenimiento de las espinas dendríticas, por lo que podría proteger frente al deterioro de la memoria y representar una diana interesante para el tratamiento de la EA antes de su aparición. Interesantemente, la alimentación con la dieta rica en grasa no exacerbó la patología cognitiva producida por la falta del PPAR β/δ . Estos resultados coinciden con lo observado al estudiar marcadores de la señalización de la insulina y la neuroinflamación, apoyando y reforzando el papel de este receptor a nivel central. Por otro lado, los resultados obtenidos en cuanto al peso corporal y las pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina muestran que los cambios observados son debidos a la ingesta continuada de la dieta rica en grasa y no a la falta de este receptor nuclear, probablemente debido a la intervención dietética continuada.

Como se ha descrito en la introducción de esta tesis, los PPAR son considerados reguladores metabólicos magistrales de la homeostasis energética (Y.-X. Wang, 2010). Actúan principalmente como sensores de lípidos y regulan el metabolismo de todo el organismo en respuesta a la ingesta de estos en la dieta, induciendo o reprimiendo la expresión de genes implicados en el metabolismo de los lípidos y la glucosa (Grygiel-Górniak, 2014; Sáez-

Orellana et al., 2020). Es por ello que agonistas de estos receptores nucleares son utilizados para el tratamiento de diferentes patologías, incluyendo la DMT2. Hasta hace poco, la mayoría de los estudios centrados en el papel de los PPARs en la neurodegeneración han estado basados en las isoformas α y γ , aunque hay estudios que demuestran que los agonistas del PPAR β/δ son capaces de disminuir la neuroinflamación, la neurodegeneración, la carga de A β y mejorar la función cognitiva en modelos de ratón y de rata de EA (de la Monte et al., 2017; Reich et al., 2018; Tong, Deochand, et al., 2016). A pesar de ser la isoforma predominante en el SNC, su papel en los desórdenes neurodegenerativos no ha sido caracterizado a fondo. Por lo tanto, teniendo en cuenta la relación entre las disfunciones metabólicas y el déficit cognitivo (Leszek et al., 2017), ha aumentado el interés en este receptor y sus agonistas como posible intervención terapéutica de la EA y los desórdenes cognitivos relacionados con la obesidad.

En cuanto a las alteraciones metabólicas, los agonistas del PPAR β/δ han demostrado disminuir sustancialmente la adiposidad y mejorar la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina (Palomer et al., 2018; Salvadó et al., 2012; N. S. Tan et al., 2016). Sin embargo, se ha observado que los ratones deficientes en este receptor presentan una reducción significativa del peso en las primeras semanas de vida en comparación con los controles, diferencias que desaparecen cuando pasan a ser adultos (J. M. Peters et al., 2000). Estos datos están de acuerdo con los obtenidos en la presente tesis, donde no se observaron cambios en el peso inducidos por el genotipo.

Por otro lado, es bien sabido que la alimentación con una dieta rica en grasa causa un incremento significativo del peso corporal, de la intolerancia a la glucosa y de la resistencia a la insulina (Álvarez-Amor et al., 2021; Musso et al., 2003), datos que se confirman en nuestro estudio. Sin embargo, no

encontramos alteraciones en estos parámetros debidos al genotipo. Una posible explicación para estas discrepancias podría ser el tiempo de exposición a la dieta rica en grasa, que en nuestro caso fue desde el destete, a los veintiún días, hasta su sacrificio, a los seis meses. En este contexto y en línea con estudios previos, animales jóvenes expuestos a la dieta rica en grasa durante un largo periodo de tiempo, como es el caso de este estudio, podrían mostrar una mayor plasticidad a la dieta (Burke et al., 2021) y por esta razón, nuestros ratones no mostrarían diferencias debidas al genotipo.

Como ha sido ampliamente comentado en la introducción de la presente tesis, las espinas dendríticas juegan un papel clave en el proceso de aprendizaje, mientras que la alteración de la plasticidad sináptica se ha correlacionado directamente con una afectación de la memoria (Ettcheto et al., 2021; Knott & Holtmaat, 2008; Pelucchi et al., 2022). Además, diferentes indicadores morfológicos y bioquímicos sugieren que unos de los primeros daños que ocurren en la EA son producidos sobre las espinas dendríticas, dando lugar a un fallo sináptico (Ammassari-Teule, 2020). Por ello, nuestro estudio se ha centrado en la evaluación de estas estructuras con el fin de evaluar el efecto de la deficiencia del PPAR β/δ en la densidad de espinas a nivel hipocampal. En esta línea, nuestros resultados muestran que los ratones PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ sufrieron una disminución del número de espinas dendríticas en el caso de aquellos animales alimentados con la dieta convencional, y que esta afectación no fue exacerbada por la dieta rica en grasa, lo que sugiere que este receptor es necesario para el mantenimiento de estas estructuras y, consecuentemente, para evitar el deterioro cognitivo. Por el contrario, en el caso de los ratones WT alimentados con una dieta rica en grasa, sí que se observó una disminución del número de espinas dendríticas causada por la ingesta de la dieta rica en grasa. Esto coincide con previos estudios que mostraron que la alimentación con este tipo de dieta generaba una alteración de proteínas sinápticas, junto con una

alteración del LTP y un cierto grado de inflamación local y sistémica, todo ello favoreciendo la pérdida de espinas dendríticas (Bocarsly et al., 2015; Chunchai et al., 2018; Hao et al., 2016). Estos datos se correlacionaron con los obtenidos en el NORT y también con los resultados de previos estudios, como el llevado a cabo por Barroso y colaboradores (Barroso et al., 2013).

En este caso, no se realizó la prueba del MWM para evaluar la cognición de los ratones, ya que la falta de esta isoforma ha sido asociada con alteraciones del rendimiento físico que implique un ejercicio intenso como es correr o, en este caso, nadar. Esto es debido a que el PPAR β/δ es la isoforma más expresada en el músculo esquelético, especialmente en las fibras oxidativas, por lo que ha sido ampliamente demostrado que juega un papel clave en la resistencia en carrera (Rockl et al., 2007; Schuler et al., 2006; Y.-X. Wang et al., 2004). En concreto, estas fibras expresan principalmente enzimas implicadas en la oxidación de ácidos grasos, habiéndose demostrado que la sobreexpresión del PPAR β/δ en este tejido induce la reorganización de esas fibras, aumentando el porcentaje de fibras oxidativas y disminuyendo la fatiga muscular, siendo crucial también para la resistencia (Y.-X. Wang et al., 2004). De esta forma, la falta de este receptor podría afectar al rendimiento en natación, convirtiendo al MWM en una prueba poco fiable para evaluar la cognición de estos ratones.

Avanzando hacia un nivel más molecular, DBN1 es una proteína de unión a la actina con presencia abundante en las espinas dendríticas, especialmente en regiones postsinápticas de sinapsis excitatorias (Sekino et al., 2007). Se ha descrito que podría tener un papel relevante en el control de la morfología y la función sináptica (Ao et al., 2014). De hecho, uno de los primeros cambios que preceden a la pérdida sináptica y a la neurodegeneración en la EA y los desórdenes cognitivos relacionados es una pérdida dramática de DBN1 (Dun & Chilton, 2010; Ivanov et al., 2009). En línea con todo ello, el presente

estudio mostró un descenso significativo de los niveles de DBN1 en el hipocampo inducido por la falta de PPAR β/δ , hecho que se correlaciona con el análisis de las espinas dendríticas mencionado anteriormente. Por lo tanto, este trabajo sugiere que el receptor PPAR β/δ contribuye activamente a la preservación de estas estructuras a través de la regulación de DBN1. Consistente con todo ello, se observó el mismo patrón al estudiar los niveles de otras dos proteínas sinápticas, neurexina y PSD95. La neurexina es una de las proteínas de adhesión celular implicada en la conexión de compartimentos pre y postsinápticos, mediante la interacción con su pareja de unión, la neuroligina. Alteraciones en ambas proteínas han sido relacionadas con desórdenes neurodegenerativos, siendo esenciales para el buen funcionamiento de la sinapsis (Cuttler et al., 2021). De la misma forma, PSD95, tal y como se ha mencionado en la introducción, es un componente básico de la densidad postsináptica, encontrándose implicada en la transmisión glutamatérgica, en la plasticidad sináptica y en la formación de espinas dendríticas (Coley & Gao, 2018). Por lo tanto, la disminución de los niveles proteicos de PSD95 y neurexina en este modelo confirma que PPAR β/δ juega un papel importante en la plasticidad sináptica.

En cuanto a la sinaptofisina, la reducción de esta glicoproteína que se encuentra en vesículas sinápticas se ha relacionado con el desarrollo de alteraciones de la memoria (H. Du et al., 2020; X. Zhang et al., 2019). Además, se ha descrito una disminución de los niveles de esta proteína tras una alimentación rica en grasa (Kalarchian & Marcus, 2012; F. Li et al., 2019; H. Shi et al., 2020), interconectando así a la sinaptofisina con la obesidad y la alteración de la memoria. Nuestros resultados mostraron una disminución significativa de los niveles de esta proteína en el hipocampo inducida por la alimentación con la dieta rica en grasa. Sin embargo, no se observó ningún cambio producido por el genotipo.

Por otro lado, también se ha descrito que la actividad neuronal regula el transporte de BDNF a las dendritas, el cual está relacionado con la modulación de la transmisión sináptica y la sinaptogénesis (Etcheto et al., 2021). Cuando se une a su receptor, el receptor de tropomiosina cinasa B (Trkb, del inglés *tropomyosin receptor kinase B*), este se dimeriza y activa la vía de la proteína cinasa regulada extracelularmente (ERK, del inglés *extracellular signal-regulated kinase*) (Caffino et al., 2020; B. Y. Kim et al., 2017), permitiendo que este factor neurotrófico ejerza su papel como regulador de la plasticidad sináptica y la memoria. En la presente tesis, se observó una disminución significativa de los niveles de BDNF en los animales PPAR β / δ ^{-/-} alimentados con la dieta rica en grasa en comparación con el resto de grupos, sugiriendo que la falta del receptor por sí sola no es suficiente para alterar los niveles de BDNF.

Otro de los acontecimientos característicos de las enfermedades neurodegenerativas es la neuroinflamación, siendo ampliamente reconocida como una de las mediadoras del deterioro de la memoria (Fourrier et al., 2019; McGrattan et al., 2019). El impacto de este complejo proceso, que incluye la alteración de la vía del receptor tipo toll 4 (TLR4, del inglés *toll-like receptor 4*) y la activación glial, entre otros, induce la liberación de citoquinas proinflamatorias y da lugar a circuitos neuronales aberrantes, contribuyendo todo ello a la aceleración del deterioro cognitivo (Jin et al., 2019; Malpetti et al., 2020). Sin embargo, la implicación de la inflamación no está solamente ceñida al cerebro. De hecho, el consumo de una dieta rica en grasa se ha relacionado con un aumento de la inflamación y niveles de ácidos grasos en el cerebro, que podrían unirse y activar la vía del receptor TLR4, lo que da lugar a la liberación de citoquinas proinflamatorias. De esta manera, la función cognitiva se vería afectada mediante la alteración de la morfología hipocámpal y de la plasticidad sináptica inducida por la inflamación (Pugazhenthil et al.,

2017; D. Wang et al., 2015). En este contexto, el receptor PPAR β/δ ha sido también relacionado con la modulación de la inflamación, tanto a nivel periférico como central (Chehaibi et al., 2017; Kuang et al., 2012). Nuestro estudio demostró que la falta del receptor PPAR β/δ incrementa la gliosis en el hipocampo, contribuyendo al aumento de actividad de la microglía y los astrocitos. En la misma línea, los niveles proteicos de TLR4 y del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas (NFK β , del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) también reflejaron este aumento en los animales carentes de este receptor. De acuerdo con nuestros resultados, en el estudio llevado a cabo por Rodríguez-Calvo y colaboradores, se demostró que el uso del agonista de PPAR β/δ GW501516 inhibió la producción de citoquinas inducidas por el lipopolisacárido (LPS) mediante la prevención de la activación de la vía de NFK β (Rodríguez-Calvo et al., 2008). Interessantemente, nuestro estudio demostró que la dieta rica en grasa promovía alteraciones similares a las observadas cuando existía una deficiencia de PPAR β/δ , probablemente debido al aumento de ácidos grasos libres asociados al consumo de este tipo de dieta, los cuales podrían activar la vía de TLR4 dando lugar a un aumento de la neuroinflamación (Pugazhenthii et al., 2017). Excepcionalmente, en el caso de la activación microglial, mientras que la alimentación con una dieta rica en grasa indujo neuroinflamación en los ratones WT, en el caso de los ratones deficientes de PPAR β/δ la dieta no exacerbó estos cambios. Estos hechos ocurrieron de la misma manera en el caso de los niveles de TLR4, probablemente debido a que la inflamación observada en los ratones PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ ya había alcanzado niveles tan altos que no podían incrementarse con una intervención crónica de baja intensidad como es la dieta.

Por otro lado, nuestros resultados mostraron un aumento significativo en los niveles proteicos de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) en el hipocampo

debido al genotipo. Este incremento fue similar al observado tras el consumo de una dieta rica en grasa, advirtiéndose una tendencia análoga en el caso de NFK β y la astrogliosis. Sin embargo, la alimentación de los ratones PPAR $\beta/\delta^{-/-}$ con la dieta rica en grasa no exacerbó estos cambios.

Se ha visto que la expresión de PTP1B está ampliamente relacionada con la activación de la microglía, que a su vez se potencia debido a procesos proinflamatorios, lo que sugiere que es un importante regulador positivo de la inflamación (Song, Jung, et al., 2016). Sin embargo, PTP1B no solo está relacionado con mecanismos neuroinflamatorios. Ha sido descrito que ratones en los que se llevó a cabo la delección del gen *Ptp1b* presentaban una reducción de la resistencia a la insulina, mostrando así su papel regulador de la sensibilidad a esta hormona (Teimouri et al., 2022; Z. Yang et al., 2018) y convirtiéndola en una diana terapéutica prometedora para el diseño de fármacos antidiabéticos. Sin embargo, el papel de PTP1B va mucho más allá, ya que la actividad de esta proteína a nivel hipocampal ha sido relacionada con una alteración de la señalización de la insulina (Kuga et al., 2018), mostrando que su inhibición sería una buena estrategia para eludir las alteraciones sinápticas y la pérdida cognitiva (Fuentes et al., 2012; Ricke et al., 2020). De esta manera, nuestros resultados confirman los estudios llevados a cabo por de la Monte y colaboradores, que demuestran que la regulación a la baja de PPAR β/δ estaría relacionada con la resistencia a la insulina en el cerebro y la neuroinflamación, dos de las características fundamentales de la EA (de la Monte & Wands, 2006).

Como se ha mencionado a lo largo de la introducción de esta tesis, el receptor de la insulina y la vía de señalización de esta hormona juegan un papel fisiológico fundamental a nivel neuronal, contribuyendo a la formación de sinapsis, a la plasticidad sináptica y a la disminución de la neuroinflamación.

Haciendo un breve resumen, una vez que el receptor de la insulina es fosforilado, se produce la fosforilación y activación de AKT, que a su vez fosforila e inactiva a GSK3 β . En este contexto, la disfunción de esta vía da lugar a la activación de GSK3 β , la cual ha sido relacionada con la resistencia a la insulina y el deterioro cognitivo (Qi et al., 2015; L. Yang et al., 2020; Y. Zhang et al., 2018). En nuestro estudio, los niveles proteicos de p-AKT y p-GSK3 β sufrieron una reducción en el hipocampo de los ratones PPAR $\beta/\delta^{-/-}$, datos que concuerdan con la reducción del número de espinas dendríticas y el aumento de la neuroinflamación observados en este genotipo. Sin embargo, no se observaron cambios debidos a la variable dieta, probablemente debido al hecho de que la falta de PPAR β/δ interfiere en la unión de los ácidos grasos a su receptor. También es de destacar el incremento observado en los niveles del RI en los ratones PPAR $\beta/\delta^{-/-}$, lo cual podría deberse a un mecanismo compensatorio para intentar lidiar con esta alteración de la vía de la insulina. Estos resultados coinciden con lo observado en el estudio realizado por Buck y colaboradores, donde demostraron que la inhibición del IGFR-1, correceptor de la vía de señalización de la insulina, generaba una activación compensatoria del RI (Buck et al., 2010), reconfirmando nuevamente el papel clave del receptor PPAR β/δ en este proceso.

En resumen, este primer estudio de la presente tesis doctoral demuestra por primera vez que la falta del receptor PPAR β/δ a nivel cerebral constituye no solo un nuevo factor de riesgo para la pérdida cognitiva en desórdenes neurológicos, sino que también se trata de una molécula clave dirigida a las vías fundamentales que conducen al deterioro de la memoria y a la EA, como son la neuroinflamación, la resistencia la insulina, la alteración de las espinas dendríticas y la plasticidad sináptica, entre otras. Por otro lado, se observó que la alimentación con una dieta rica en grasa afectaba a mecanismos implicados en procesos de memoria en la presencia del receptor, pero no exacerbó estos

procesos en la ausencia de este. Además, en un estudio realizado por Barroso y colaboradores se vio que la falta del receptor PPAR β/δ inducía una activación de algunos de los eventos patogénicos propios de esta enfermedad, como son un aumento de los niveles de BACE1 y de RAGE, así como de la neuroinflamación y de la hiperfosforilación de Tau (Barroso et al., 2013). Esto apoya la idea de que agonistas de este receptor podrían representar una alternativa interesante para el tratamiento de la EA, hecho que ha sido también demostrado por otros estudios (Kalinin et al., 2009; Malm et al., 2015; Reich et al., 2018). Por lo tanto, el PPAR β/δ representa, en sí mismo, una nueva y prometedora diana terapéutica para el diseño de nuevas estrategias enfocadas en frenar o mejorar el deterioro cognitivo presente en la mayoría de las enfermedades neurológicas y en aquellos estados que podrían preceder a la EA.

Estudio del híbrido RHE-HUP como posible candidato para el tratamiento de la EA exacerbada por una dieta rica en grasa

Como se ha dicho anteriormente, la EA hoy en día es reconocida como una enfermedad multifactorial y heterogénea donde las alteraciones metabólicas juegan un papel importante (Carmo Carreiras et al., 2013; Gong et al., 2018; Iqbal & Grundke-Iqbal, 2010). RHE-HUP es un fármaco híbrido donde se combinan el farmacóforo rheina, con actividad Tau-antiagregante, y la huprina Y, que es un potente inhibidor de la AChE. En su totalidad, este híbrido demostró tener una fuerte actividad inhibitoria *in vitro* contra sus principales dianas (la agregación de Tau y la AChE). Sorprendentemente, también presentó una potente actividad inhibitoria de BACE1 (Viayna et al., 2014). Los estudios *ex vivo* en cortes de cerebro de ratones C57BL/6 revelaron que este híbrido protegía eficazmente contra la disfunción sináptica inducida por A β , previniendo de la pérdida de proteínas sinápticas. Por otro lado, los estudios *in*

vivo demostraron que este híbrido era capaz de disminuir los niveles de A β , fosforilación de Tau y déficit cognitivo en un modelo doble transgénico de ratón APP^{swe}/PS-1dE9 (Serrano et al., 2016). Sin embargo, hasta ahora, no se había estudiado la eficacia de este híbrido en un modelo familiar de EA exacerbado por la ingesta de una dieta rica en grasa. Por ello, en este trabajo se evaluaron los efectos de este compuesto en ratones hembra APP/PS1 de seis meses de edad alimentadas con una dieta rica en grasa para generar simultáneamente una condición similar a la DMT2.

En la presente tesis doctoral se ha demostrado que el híbrido RHE-HUP, a pesar de no ser capaz de inducir ningún cambio en los parámetros periféricos metabólicos, redujo significativamente la neuroinflamación, la deposición de A β y la fosforilación de Tau, siendo todos ellos importantes mecanismos implicados en el desarrollo de la EA. Además, este híbrido también fue capaz de aumentar los niveles de proteínas relacionadas con la sinapsis, como el BDNF, dando lugar a un aumento del número de espinas dendríticas, mejorando el aprendizaje y la memoria.

Como se ha mencionado en el apartado anterior de la discusión, el consumo de una dieta rica en grasa se ha relacionado con un aumento del peso corporal y, por lo tanto, con la obesidad y el posible desarrollo de resistencia a la insulina. Nuestro estudio confirmó que la alimentación con una dieta rica en grasa daba lugar a un aumento del peso corporal, hiperglucemia y resistencia a la insulina, todo ello acompañado de una disminución de los niveles de IRS2 en el hígado. Esta proteína está implicada en la regulación de la señalización de la insulina y su deficiencia ha demostrado estar implicada en el desarrollo de resistencia a esta hormona, ya que se ha reportado que ratones deficientes en IRS2 desarrollaban DMT2 como resultado de la resistencia a la insulina en el hígado y la afectación de las células β (Suzuki et al., 2004). Sin embargo, el

tratamiento con RHE-HUP no fue capaz de revertir estos efectos, lo que nos llevó a la conclusión de que los beneficios derivados del tratamiento con RHE-HUP podrían no ser debidos a una regulación metabólica periférica, sino más bien a una regulación a nivel central. Una posible explicación podría ser que esta molécula fue específicamente diseñada para atacar múltiples dianas implicadas en la patogénesis de la EA, es decir, para alcanzar objetivos biológicos localizados en el SNC. De hecho, los estudios realizados en ensayos paralelos de permeabilidad de membranas artificiales para la BHE (PAMPA-BBB) demostraron claramente que este híbrido era capaz de atravesar la BHE y llegar al cerebro (Viayna et al., 2014). Este hecho fue confirmado tras observar cómo el fármaco conseguía disminuir los niveles de A β y de fosforilación de Tau en el estudio mencionado previamente, donde ratones APP^{swe}/PS-1dE9 eran tratados con esta molécula (Serrano et al., 2016). De la misma manera, en estudios de biodistribución tanto *in vivo* (Viayna et al., 2020) como *ex vivo* (Galdeano et al., 2012; Sola, Aso, et al., 2015; Sola, Viayna, et al., 2015), donde se usaron otros compuestos híbridos estrechamente relacionados con nuestra molécula en términos de estructura química y propiedades fisicoquímicas, se demostró que estos compuestos ingresan muy fácilmente en el cerebro, algunos de ellos con una ratio cerebro/plasma superior a la del fármaco más prescrito para el tratamiento de la EA, el donepezilo (Viayna et al., 2020). Muy probablemente, este podría ser también el caso de RHE-HUP, lo que podría explicar sus efectos preferencialmente centrales frente a los periféricos observados en este trabajo.

La insulina en el cerebro no solo tiene un papel en la regulación del metabolismo energético, sino que también está implicada en muchas otras funciones como son la neurogénesis, la plasticidad sináptica, la memoria, el aprendizaje y la modulación de los niveles de neurotransmisores (Derakhshan & Toth, 2013). Diferentes estudios han demostrado que niveles reducidos de

insulina o de la actividad de esta hormona podrían contribuir a una gran cantidad de procesos patológicos que caracterizan a la EA (Baker et al., 2011; Kuusisto et al., 1997; T. Matsuzaki et al., 2010; Sędzikowska & Szablewski, 2021). Uno de los componentes principales de la vía de la señalización de la insulina y factor clave en la DMT2 es el ya mencionado IRS2, el cual también ha demostrado tener un papel en la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (De Sousa et al., 2020; Tumminia et al., 2018). Nuestros resultados mostraron una disminución de los niveles de esta proteína a nivel hipocampal en los ratones APP/PS1 alimentados con una dieta rica en grasa, niveles que se recuperaron tras el tratamiento con RHE-HUP. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Tanokashira y colaboradores, donde mostraron que ratones adultos jóvenes C57BL/6J que carecían de IRS2 presentaban perturbaciones en el comportamiento asociadas al hipocampo, debido a las alteraciones del metabolismo energético cerebral inducidas por la deficiencia de esta proteína (Tanokashira et al., 2021).

Además, se ha demostrado que la vía de señalización de IRS2 tiene un papel en la fosforilación de Tau. Diversos estudios han sugerido que una disminución de la funcionalidad de esta vía podría dar lugar a una hiperfosforilación de Tau, considerada uno de los mecanismos tempranos en la patología de la EA (Clodfelder-Miller et al., 2006; Ochiai et al., 2021; Schubert et al., 2003). Una de las principales cinasas implicadas en la fosforilación de esta proteína es GSK3 β (R. Das et al., 2020; Hisanaga et al., 2022; O'Neill et al., 2001). La fosforilación de esta cinasa en el residuo tirosina 216 da lugar a su activación, lo que resulta no solo en un aumento de la fosforilación de Tau (T. K. Das et al., 2019; Y. Zhang et al., 2018), sino que también puede contribuir a la muerte neuronal a través de otros mecanismos (Toral-Rios et al., 2020). En este sentido, se ha observado que la fosforilación de GSK3 β en este residuo podría ser activada por estímulos proapoptóticos, entre los que se encuentra la

acumulación del péptido A β , interconectando así las dos hipótesis más representativas de la EA (Kaytor & Orr, 2002).

En nuestro caso, la administración de RHE-HUP redujo significativamente la fosforilación de Tau en el hipocampo, mediante la regulación de IRS2 y p-GSK3 β _{tyr216}. Este es uno de los motivos que explicarían la restauración del número de espinas dendríticas, resultando en la mejora del comportamiento que se observó en los ratones APP/PS1 alimentados con la dieta rica en grasa tras el tratamiento.

Además, el otro gran evento patogénico de la EA es la acumulación de los depósitos de A β . Distintos estudios han interconectado ambos procesos definiendo a este péptido como una de las causas de la hiperfosforilación de Tau y la formación consecuente de los ONF (Hernández et al., 2010; Nisbet et al., 2015). Cuando se estudiaron los niveles de A β a nivel hipocampal y cortical, se observó la misma tendencia que en el estudio de los niveles de hiperfosforilación de Tau: una disminución de los niveles de este péptido en ambas áreas del cerebro tras el tratamiento con RHE-HUP. A su vez, esto se correlacionó con la disminución observada en los niveles de A β ₄₂, siendo esta la forma más hidrofóbica y con mayor tendencia a agregarse (Multhaup et al., 2015; T. Qiu et al., 2015).

En este sentido, tal y como fue descrito por Pérez-Areales y colaboradores, el fármaco administrado en la presente tesis parece tener la capacidad de inhibir la AChE (Pérez-Areales et al., 2017). Esta enzima es una de las dianas principales de la EA: el déficit colinérgico ha sido ampliamente observado en los pacientes de EA y la mayoría de los tratamientos actuales para esta enfermedad se encuentran dirigidos hacia esta diana (Hampel et al., 2018; Schachter & Davis, 2022). Pero la importancia de esta enzima en la EA va mucho más allá, ya que se ha descrito que podría unirse al péptido A β y

favorecer su deposición, aumentando su neurotoxicidad y convirtiendo al complejo formado por la AChE y el A β en mucho más tóxico para las células que el A β por sí solo (De Ferrari et al., 2001; Inestrosa et al., 1996; Viayna et al., 2014). RHE-HUP ha demostrado ser capaz de unirse al sitio aniónico catalítico (CAS), lugar de la AChE donde se unen los inhibidores de esta enzima, y al mismo tiempo al sitio aniónico periférico (PAS), lugar de reconocimiento del péptido A β en la AChE, dando lugar así a un compuesto dotado con una potente actividad anticolinesterásica y efectos antiagregantes de A β (Holzgrabe et al., 2007; Musial et al., 2007; Viayna et al., 2014).

Teniendo todo ello en cuenta, la disminución observada en esta tesis de la producción de A β y su subsecuente acumulación podría ser debido a cuatro principales factores: 1) la inhibición de la AChE, evitando así la interacción del péptido A β con el PAS y la consecuente formación de los agregados tóxicos; 2) la disminución de la actividad de la enzima BACE1, inhibiendo de esta manera la vía amiloidogénica del procesamiento de la proteína APP; 3) la reducción directa de los niveles de APP; y 4) la activación de la vía no-amiloidogénica mediante el aumento de los niveles proteicos de ADAM10 (Bandyopadhyay et al., 2007; Coimbra et al., 2018; Delpont & Hewer, 2022; Espeseth et al., 2005; Farkhondeh et al., 2019). Además, nuestro estudio mostró una reducción tras el tratamiento con RHE-HUP de los niveles del fragmento C-terminal de APP (APP-CTF), proteína que ha sido relacionada con el aumento de la neurodegeneración debido a su interacción con las células microgliales, causando neuroinflamación y activando la respuesta celular de estrés (Delpont & Hewer, 2022) y del fragmento sAPP β , el cual no presenta o presenta menor efectividad que el fragmento sAPP α en el apoyo neurotrófico (Tackenberg & Nitsch, 2019). A pesar de que se ha descrito que la acumulación intracelular de sAPP β podría ser uno de los primeros eventos patológicos de la EA (Soto-Mercado et al., 2020), hay otros estudios que apoyan que el

fragmento sAPP β no es necesariamente perjudicial para la función neuronal (Chasseigneaux et al., 2011; Hesse et al., 2018).

Teniendo en cuenta que una de las posibles estrategias para disminuir los niveles de A β es la de potenciar su eliminación, es de destacar que el tratamiento con RHE-HUP fue capaz de aumentar los niveles de IDE en el hipocampo, una de las principales enzimas encargadas de la degradación de este péptido (Xin et al., 2018). Pero, además, esta enzima tiene un papel muy importante en la degradación de la insulina, de manera que esta hormona es capaz de bloquear competitivamente la unión de A β y su degradación mediante IDE, dando lugar a un aumento de la deposición de A β en una situación de hiperinsulinemia (Kurochkin et al., 2018). Por lo que el aumento de los niveles hipocámpales de IDE sería otro de los mecanismos por los que el tratamiento con RHE-HUP daría lugar a una disminución de la deposición de A β y a la mejora cognitiva (Pivovarova et al., 2016).

Posteriormente, se llevó a cabo el estudio del estado neuroinflamatorio de los animales, ya que, como se ha descrito previamente, la actividad glial juega también un papel importante en el desarrollo y transcurso de diferentes enfermedades neurodegenerativas, entre las que se encuentra la EA (W. Chen et al., 2016; H. Hong et al., 2016; F. Zhang & Jiang, 2015). Aunque la principal función de la glía es la de proteger al SNC cuando existe algún estímulo perjudicial, cuando esta respuesta se vuelve excesiva y mantenida en el tiempo puede causar o contribuir a la patología (Rodríguez-Gómez et al., 2020). Diferentes estudios han relacionado la presencia de A β y la hiperfosforilación de Tau con un aumento de la activación microglial y astrocítica (Ismail et al., 2020; Metcalfe & Figueiredo-Pereira, 2010; Verri et al., 2012). Por un lado, la microglía es capaz de tener un efecto protector, donde es capaz de eliminar el A β y los desechos neuronales, remodelando las sinapsis y liberando factores

de crecimiento. Pero, por otro lado, libera sustancias neurotóxicas y proinflamatorias que pueden causar o contribuir al daño del tejido y a la patología de la enfermedad, dando lugar al progreso de la enfermedad (Ismail et al., 2020; Lyman et al., 2014). De esta forma, se generaría un círculo vicioso en el que el péptido A β potencia la liberación de sustancias inflamatorias y, al mismo tiempo, estas sustancias potencian la formación y acumulación de A β , debido a un aumento en su producción y a la incapacidad de las células gliales para llevar a cabo su eliminación (Z. Cai et al., 2014). Además, se ha propuesto que otro punto de conexión entre el A β y la hiperfosforilación de Tau sería la activación de la microglía, ya que se ha observado que la activación generada por el péptido A β precede a la agregación de Tau (Guzman-Martinez et al., 2019; Ismail et al., 2020; Metcalfe & Figueiredo-Pereira, 2010) y al mismo tiempo esta hiperfosforilación participa en la neuroinflamación, contribuyendo así también al mencionado círculo vicioso (Cortés et al., 2018; Morales et al., 2010, 2013). Las otras grandes células gliales del SNC, los astrocitos, se encuentran también implicados en el proceso neuroinflamatorio, participando en la eliminación del péptido A β mediante la secreción de enzimas (Mulder et al., 2012) y, como la microglía, rodeando a las PS, dando lugar a la activación de estas células gliales (Medeiros & LaFerla, 2013).

Como se ha descrito a lo largo de esta tesis, el consumo de una dieta rica en grasa se ha relacionado con un aumento de la resistencia a la insulina, lo que al mismo tiempo se ha vinculado con un aumento de la fosforilación de Tau, un aumento de la formación y la deposición de los oligómeros de A β y una activación de cascadas proinflamatorias y de la neuroinflamación, contribuyendo al desarrollo del déficit cognitivo (M de la Monte, 2012; Reilly et al., 2020; Sánchez-Sarasúa et al., 2020). En este sentido, el estudio llevado a cabo por Wieckowska-Gacek y colaboradores demostró que animales transgénicos APP^{sw}e alimentados con una dieta occidental exhibían un nivel

de neuroinflamación y aceleramiento de la patología amiloide similar a la inducida tras la administración del LPS, caracterizado por su carácter proinflamatorio. De esta manera, este estudio dejó patente la importancia que puede llegar a tener la dieta en la neuroinflamación y, consecuentemente, en la EA (Więckowska-Gacek et al., 2021). Acorde con esto, la disminución observada en la activación de la microglía y los astrocitos tras el tratamiento con RHE-HUP podría estar relacionada con la disminución de los niveles de la deposición de A β y de la fosforilación de Tau, pero también debido a la mejora en la vía de señalización de la insulina a nivel central observada con el tratamiento.

En esta línea, y como se ha dicho en el apartado anterior de la discusión, los TLR tienen un papel importante en el daño cerebral y en la neurodegeneración. Específicamente, la alteración de la señalización de TLR4 se ha observado en la EA, de manera que un aumento de los niveles de este receptor ha sido descrito en la corteza de pacientes de EA (Chakrabarty et al., 2018; D. G. Walker et al., 2018) y en cerebros de ratas expuestos a A β (Gold & El Khoury, 2015; Kiasalari et al., 2017). La activación de TLR4 da lugar a la estimulación del NFK β , cuya sobreactivación provoca la liberación de grandes cantidades de sustancias proinflamatorias, como TNF- α , IL-6 o IL-1 β (Fakhoury, 2018). Además, los astrocitos pueden ser activados a través de la vía de NFK β , dando lugar a la liberación del complemento C3, el cual se une al receptor C3aR neuronal, favoreciendo la alteración de la morfología de las espinas dendríticas y contribuyendo a la disfunción neuronal (Lian et al., 2015). Al mismo tiempo, como se ha descrito anteriormente, se ha propuesto la activación de la vía de TLR4 como el posible mecanismo por el que los ácidos grasos inducen una respuesta inflamatoria (Pugazhenthii et al., 2017), mostrando otro posible punto de unión entre las alteraciones metabólicas y cognitivas. Teniendo en cuenta todo esto, la atenuación de la neuroinflamación observada tras el tratamiento

con RHE-HUP podría estar relacionada con la disminución de los niveles de TLR4 en el hipocampo. De igual manera, otro estudio demostró que el tratamiento con resveratrol provocaba una disminución de la inflamación gracias a la atenuación del incremento de los niveles de TLR4 y de la activación de su vía de señalización (Azimi et al., 2015; Z. Zhang et al., 2014).

En el mismo sentido, PTP1B también mostró una disminución significativa tras el tratamiento con RHE-HUP. Como se ha descrito previamente en esta discusión, PTP1B ha sido relacionado con la neuroinflamación, de manera que su inhibición se ha correspondido con una atenuación de la activación microglial, protegiendo así del déficit cognitivo (B. Liu et al., 2019; Song, Jung, et al., 2016). Por esta razón, los inhibidores de PTP se han sugerido como una estrategia prometedora para modular la activación microglial en enfermedades neuroinflamatorias, como es la EA (Olloquequi et al., 2022; Song, Kim, et al., 2016). Como ha sido igualmente discutido previamente, esta fosfatasa se ha relacionado también con la DMT2, siendo un punto de unión entre la EA y las alteraciones metabólicas. PTP1B tiene un papel clave en la fosforilación de algunos de los componentes de la vía de señalización de la insulina. Es por ello que inicialmente el interés en esta fosfatasa estuvo basado en su actividad reguladora de receptores con un papel importante en enfermedades metabólicas (Olloquequi et al., 2022), pero estudios como el llevado a cabo por Wang y colaboradores dejaron patente su posible antagonismo en el desarrollo de la EA. En este estudio se demostró que, mediante la administración de ácido ferúlico en un modelo preclínico de DM, se observaban efectos neuroprotectores en el déficit cognitivo a través de la reducción de la expresión de PTP1B, causando una activación de la vía de la señalización de la insulina a nivel cerebral. Además, también reportaron una disminución de la acumulación de A β y p-Tau en el cerebro, junto con una reducción de citoquinas asociadas con la neuroinflamación, participando

también en la mejora observada en el aprendizaje y la función cognitiva (H. Wang et al., 2017). Todo ello sugiere que la regulación a la baja de PTP1B podría ser clave en la mejora de las características advertidas en la patogénesis de la EA mediante la regulación de la vía de la señalización de la insulina y los procesos neuroinflamatorios (Nakandakari et al., 2019).

La liberación de sustancias proinflamatorias, como la IL-1 β , por la microglía durante el proceso inflamatorio afecta a las espinas dendríticas, antagonizando el efecto estimulador de BDNF sobre la génesis de nuevas espinas (Dorostkar et al., 2015). En un entorno patológico, la liberación de estas citoquinas contribuye a una excesiva eliminación de los terminales sinápticos, causando disfunción sináptica y pérdida neuronal (DiSabato et al., 2016). De hecho, otra importante vía en la que se encuentra implicado PTP1B es la de BDNF/Trkb (Vieira et al., 2017). PTP1B inhibe la vía neuronal BDNF/Trkb, mientras que la inhibición de la fosfatasa estimula la señalización de BDNF (Krishnan et al., 2015; Ozek et al., 2014). Como se ha descrito anteriormente, la unión de BDNF a su receptor provoca la activación de distintos mecanismos que permiten que lleve a cabo su crucial papel en el proceso cognitivo como regulador de procesos neuronales de supervivencia, del crecimiento y ramificación axonal y dendrítica, de la plasticidad sináptica y del número y morfología de espinas dendríticas, entre otras muchas funciones (Caffino et al., 2020; Zhao et al., 2017). Teniendo en cuenta que estudios preclínicos sugieren que el incremento de los niveles de BDNF podría ser una buena estrategia para mejorar el proceso cognitivo (Ettcheto et al., 2021; Miranda et al., 2019), la disminución de los niveles de PTP1B inducida por el tratamiento con RHE-HUP observada en este estudio y el consecuente incremento de los niveles de BDNF podrían explicar la recuperación del número de espinas dendríticas causada por el tratamiento.

En esta misma línea, se ha sugerido que otra de las vías por la que el péptido A β podría ejercer sus efectos tóxicos en la pérdida sináptica y los déficits de memoria y aprendizaje en la EA es a través de la disminución de la fosforilación del elemento de respuesta a AMPc (CREB, del inglés *c-AMP response element-binding*) y la consecuente reducción de la expresión de BDNF (Amidfar et al., 2020). De la misma forma, se ha visto que un aumento de los niveles de BDNF protege frente a la neurodegeneración inducida por Tau (S. S. Jiao et al., 2016). Es por todo ello que la pérdida de espinas dendríticas también ha sido relacionada con la presencia de A β y Tau, como demuestra el estudio llevado a cabo por Bittner y colaboradores, donde ratones que coexpresaban mutaciones en APP, PS1 y Tau presentaban una fuerte pérdida de espinas dendríticas con acumulación de Tau hiperfosforilada y A β soluble (Bittner et al., 2010). Por lo tanto, la reducción observada en estos resultados y previamente discutida de la acumulación de A β y la hiperfosforilación de Tau —causadas por el tratamiento— podrían estar también contribuyendo a la recuperación de las espinas dendríticas.

Estos resultados fueron acompañados de un aumento en los niveles de otras proteínas sinápticas. DBN1 es una proteína implicada en la resiliencia cognitiva, de manera que su preservación se ha relacionado con la neuroprotección y, por el contrario, la disminución de sus niveles en el hipocampo está vinculada con el déficit cognitivo, de forma que se ha visto una disminución de sus niveles proteicos en enfermos de EA (Counts et al., 2012; Shim & Lubec, 2002). De esta manera, nuestros resultados confirman que el incremento en los niveles de DBN1 podrían estar asociados con la mejora en la función cognitiva. En el mismo sentido, sinaptofisina y neurexina, otras dos proteínas sinápticas, presentaron el mismo perfil. La sinaptofisina sufre una disminución de sus niveles incluso en las fases tempranas de la EA, habiéndose relacionado esta disminución con el deterioro cognitivo (Griffiths

& Grant, 2022; X. Zhang et al., 2019). Por otro lado, como se ha mencionado previamente, la neurexina es una importante organizadora de las conexiones y una estabilizadora de la fuerza sináptica (Knight et al., 2011; Sindi et al., 2014). Además, se ha demostrado que los oligómeros de A β ₄₂ se pueden unir a esta proteína y que esta interacción da lugar a una disminución de su expresión, induciendo la patología sináptica (Naito et al., 2017). Esto explicaría el aumento de los niveles de neurexina producido por la disminución de A β ₄₂ observada tras el tratamiento con RHE-HUP.

Continuando con la importancia de las sinapsis, diferentes análisis *post mortem* apoyan el papel central de la pérdida sináptica en la patogenia de la EA, ya que la correlación cuantitativa de la patología celular de la EA con los déficits cognitivos indica que la pérdida de sinapsis está más sólidamente correlacionada que el número de ONF o PS, el grado de pérdida neuronal o la extensión de la gliosis (Pelucchi et al., 2022). De hecho, diferentes estudios preclínicos han relacionado la pérdida de espinas dendríticas con el deterioro de la capacidad de aprendizaje y memoria dependiente del hipocampo (Cao et al., 2016; Chabrier et al., 2014; Kandimalla et al., 2018). De esta manera existe evidencia celular que apoya la hipótesis de que la plasticidad de las espinas dendríticas proporciona un mecanismo de resiliencia cognitiva que protege del desarrollo de EA (Herms & Dorostkar, 2016; C. K. Walker & Herskowitz, 2021). En el presente estudio, se observó como la molécula RHE-HUP indujo la recuperación en el número de espinas dendríticas, que fue acompañada de una mejora de la memoria hipocampal de reconocimiento, así como una mejora de la memoria espacial y de aprendizaje, evaluadas mediante distintas pruebas de comportamiento.

En resumen, nuestros resultados demuestran que este nuevo fármaco multidiana es capaz de restaurar el número de espinas dendríticas y mejorar la

cognición, mediante la regulación de la vía de la insulina a nivel cerebral y de la neuroinflamación, contribuyendo todo ello a la disminución en los niveles de A β y de fosforilación de Tau. Sin embargo, no se observó ningún efecto de regulación metabólica a nivel periférico inducido por esta molécula, lo que sugiere que la mejora observada en nuestro modelo podría ser debida a una regulación a nivel central. De esta forma, los resultados mostrados en la presente tesis sostienen al fármaco RHE-HUP como una nueva molécula prometedora para el tratamiento de la EA, incluso en aquellos pacientes con algún tipo de alteración metabólica.

En conjunto, los trabajos de la presente tesis doctoral ponen de manifiesto dos conclusiones. Por un lado, queda demostrada la importancia del receptor PPAR β/δ como posible diana farmacológica para evitar el deterioro cognitivo característico de las enfermedades neurodegenerativas, incluso antes de la aparición de la EA, gracias a su actividad antiinflamatoria y neuroprotectora. Por otro lado, se confirma el papel del fármaco RHE-HUP como estrategia multidiana para el tratamiento de la EA, incluso en presencia de alteraciones metabólicas, gracias al efecto observado en la mejora de algunos de los eventos neuropatológicos más importantes de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente tesis doctoral son las siguientes:

Efecto de la falta del receptor PPAR β/δ en el desarrollo de alteraciones cognitivas

1. La falta del receptor PPAR β/δ conlleva al desarrollo de deterioro cognitivo independientemente de la dieta mediante diferentes mecanismos:
 - a) La pérdida del número de espinas dendríticas junto con una disminución del nivel proteico de diferentes proteínas sinápticas.
 - b) El aumento de la neuroinflamación, manifestada mediante la astrogliosis y microgliosis, así como el incremento de proteínas relacionadas con este evento patológico como son TLR4 o NFK β .
 - c) La alteración de la vía de señalización de la insulina, hecho ampliamente relacionado con el desarrollo de alteraciones cognitivas.

Efecto del tratamiento con el híbrido multidiana RHE-HUP en un modelo preclínico de la enfermedad de Alzheimer exacerbado con una dieta rica en grasa

1. El tratamiento con este fármaco mejora la señalización de la insulina a nivel cerebral, a pesar de no conseguir revertir el aumento de peso y la alteración de la vía de la glucosa producidos por la dieta rica en grasa a nivel periférico, lo que lleva a la conclusión de que los efectos derivados del tratamiento son debidos a una acción central del mismo.
2. RHE-HUP es capaz de atenuar la hiperfosforilación de Tau mediante la regulación de IRS2 y de la actividad de GSK3 β .

3. RHE-HUP reduce el número de placas A β tanto a nivel hipocampal como cortical, a través de los siguientes mecanismos:
 - a) La regulación del procesamiento de la proteína APP, mediante la reducción de los niveles proteicos de esta proteína, la disminución de la actividad de BACE1 y la activación de la vía no-amiloidogénica, con el aumento de los niveles de ADAM10.
 - b) Disminuyendo la interacción entre el péptido A β y la AChE y el consecuente aumento de su deposición, gracias a la actividad de RHE-HUP como inhibidora de esta enzima.
 - c) Aumentando la degradación del péptido A β gracias al aumento de los niveles de la proteína IDE.
4. El tratamiento con RHE-HUP reduce la reactividad glial en los ratones APP/PS1 alimentados con una dieta rica en grasa, junto con la disminución de otras proteínas relacionadas con la neuroinflamación, como PTP1B.
5. RHE-HUP aumenta la densidad de espinas dendríticas y de otros biomarcadores sinápticos, conllevando todo ello a una mejora en el proceso cognitivo.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Aguado, F., Espinosa-Parrilla, J. F., Carmona, M. A., & Soriano, E. (2002). Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *Journal of Neuroscience*, *22*(21), 9430–9444.
- Alam, S., Lingenfelter, K. S., Bender, A. M., & Lindsley, C. W. (2017). Classics in chemical neuroscience: memantine. *ACS Chemical Neuroscience*, *8*(9), 1823–1829.
- Almeida, V. N., & Radanovic, M. (2022). Semantic processing and neurobiology in Alzheimer’s disease and Mild Cognitive Impairment. *Neuropsychologia*, 108337.
- Alquier, T., & Kahn, B. B. (2004). Peripheral signals set the tone for central regulation of metabolism. *Endocrinology*, *145*(9), 4022–4024.
- Altmann, A., Tian, L., Henderson, V. W., Greicius, M. D., & Investigators, A. D. N. I. (2014). Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, *75*(4), 563–573.
- Alvarez, G., Muñoz-Montaño, J. R., Satrústegui, J., Avila, J., Bogónez, E., & Díaz-Nido, J. (2002). Regulation of tau phosphorylation and protection against β -amyloid-induced neurodegeneration by lithium. Possible implications for Alzheimer’s disease. *Bipolar Disorders*, *4*(3), 153–165.
- Álvarez-Amor, L., Sierra, A. L., Cárdenas, A., López-Bermudo, L., López-Beas, J., Andújar, E., Pérez-Alegre, M., Gallego-Durán, R., Varela, L. M., & Martín-Montalvo, A. (2021). Extra virgin olive oil improved body weight and insulin sensitivity in high fat diet-induced obese LDLr^{-/-}. Leiden mice without attenuation of steatohepatitis. *Scientific Reports*, *11*(1), 8250.
- Amelianchik, A., Sweetland-Martin, L., & Norris, E. H. (2022). The effect of dietary fat consumption on Alzheimer’s disease pathogenesis in mouse models. *Translational Psychiatry*, *12*(1), 293.
- Amidfar, M., de Oliveira, J., Kucharska, E., Budni, J., & Kim, Y.-K. (2020). The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer’s disease. *Life Sciences*, *257*, 118020.
- Ammassari-Teule, M. (2020). Early-Occurring Dendritic Spines Alterations in Mouse Models of Alzheimer’s Disease Inform on Primary Causes of Neurodegeneration. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *12*, 566615.

- Amri, E.-Z., Bonino, F., Ailhaud, G., Abumrad, N. A., & Grimaldi, P. A. (1995). Cloning of a Protein That Mediates Transcriptional Effects of Fatty Acids in Preadipocytes: HOMOLOGY TO PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(5), 2367–2371.
- ANÇEVIC IV, V., Alavi, A., Souder, E., Mozley, P. D., Gur, R. E., Benard, F., & Munz, D. L. (2000). Regional cerebral glucose metabolism in healthy volunteers determined by fluorodeoxyglucose positron emission tomography: appearance and variance in the transaxial, coronal, and sagittal planes. *Clinical Nuclear Medicine*, 25(8), 596–602.
- Anighoro, A., Bajorath, J., & Rastelli, G. (2014). Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery: miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(19), 7874–7887.
- Ao, X., Liu, Y., Qin, M., Li, C., Chen, X., Xiao, L., & Liu, J. (2014). Expression of Dbn1 during mouse brain development and neural stem cell differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 449(1), 81–87.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22(5), 208–215.
- Arenaza-Urquijo, E. M., Wirth, M., & Chételat, G. (2015). Cognitive reserve and lifestyle: moving towards preclinical Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 134.
- Arnold, S. E., Arvanitakis, Z., Macauley-Rambach, S. L., Koenig, A. M., Wang, H.-Y., Ahima, R. S., Craft, S., Gandy, S., Buettner, C., & Stoekel, L. E. (2018). Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nature Reviews Neurology*, 14(3), 168–181.
- Arshavsky, Y. I. (2006). Alzheimer's disease, brain immune privilege and memory: a hypothesis. *Journal of Neural Transmission*, 113, 1697–1707.
- Asslih, S., Damri, O., & Agam, G. (2021). Neuroinflammation as a common denominator of complex diseases (cancer, diabetes type 2, and neuropsychiatric disorders). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 6138.
- Auboeuf, D., Rieusset, J., Fajas, L., Vallier, P., Frering, V., Riou, J. P., Staels, B., Auwerx, J., Laville, M., & Vidal, H. (1997). Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor- α in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*, 46(8), 1319–1327.

Auwerx, J., Baulieu, E., Beato, M., Becker-Andre, M., Burbach, P. H., Camerino, G., Chambon, P., Cooney, A., Dejean, A., & Dreyer, C. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, *97*(2), 161–163.

Avila, J. (2009). The tau code. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *1*.

Azimi, H., Khakshur, A. A., Abdollahi, M., & Rahimi, R. (2015). Potential new pharmacological agents derived from medicinal plants for the treatment of pancreatic cancer. *Pancreas*, *44*(1), 11–15.

B

Bachman, D. L., Wolf, P. A., Linn, R., Knoefel, J. E., Cobb, S. J., Belanger, A., D'agostino, R. B., & White, L. R. (1992). Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study. *Neurology*, *42*(1), 115.

Baker, L. D., Cross, D. J., Minoshima, S., Belongia, D., Watson, G. S., & Craft, S. (2011). Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. *Archives of Neurology*, *68*(1), 51–57.

Balazs, N., Bereczki, D., & Kovacs, T. (2021). Cholinesterase inhibitors and memantine for the treatment of Alzheimer and non-Alzheimer dementias. *Ideggyogy. Sz*, *74*, 379–387.

Bali, P., Banik, A., Nehru, B., & Anand, A. (2019). Neurotrophic factors mediated activation of astrocytes ameliorate memory loss by amyloid clearance after transplantation of lineage negative stem cells. *Molecular Neurobiology*, *56*, 8420–8434.

Bandyopadhyay, S., Goldstein, L. E., Lahiri, D. K., & Rogers, J. T. (2007). Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting α -secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry*, *14*(27), 2848–2864.

Banks, W. A., Gray, A. M., Erickson, M. A., Salameh, T. S., Damodarasamy, M., Sheibani, N., Meabon, J. S., Wing, E. E., Morofuji, Y., & Cook, D. G. (2015). Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of Neuroinflammation*, *12*, 1–15.

- Banks, W. A., Kastin, A. J., Huang, W., Jaspan, J. B., & Maness, L. M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*, *17*(2), 305–311.
- Banks, W. A., Owen, J. B., & Erickson, M. A. (2012). Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacology & Therapeutics*, *136*(1), 82–93.
- Banting, F. G., & Best, C. H. (2007). The internal secretion of the pancreas. *Indian Journal of Medical Research*, *125*(3), L251.
- Barroso, E., del Valle, J., Porquet, D., Santos, A. M. V., Salvadó, L., Rodríguez-Rodríguez, R., Gutiérrez, P., Anglada-Huguet, M., Alberch, J., & Camins, A. (2013). Tau hyperphosphorylation and increased BACE1 and RAGE levels in the cortex of PPAR β/δ -null mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1832*(8), 1241–1248.
- Barthet, G., Georgakopoulos, A., & Robakis, N. K. (2012). Cellular mechanisms of γ -secretase substrate selection, processing and toxicity. *Progress in Neurobiology*, *98*(2), 166–175.
- Baskin, D. G., Sipols, A. J., Schwartz, M. W., & White, M. F. (1993). Immunocytochemical detection of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in rat brain: colocalization with phosphotyrosine. *Regulatory Peptides*, *48*(1–2), 257–266.
- Baura, G. D., Foster, D. M., Porte, D., Kahn, S. E., Bergman, R. N., Cobelli, C., & Schwartz, M. W. (1993). Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *The Journal of Clinical Investigation*, *92*(4), 1824–1830.
- Bayer, T. A., & Wirths, O. (2014). Focusing the amyloid cascade hypothesis on N-truncated A β peptides as drug targets against Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *127*, 787–801.
- Bazargani, N., & Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nature Neuroscience*, *19*(2), 182–189.
- Begg, D. P., & Woods, S. C. (2011). The central insulin system and energy balance. *Appetite Control*, 111–129.
- Bell, R. D., & Zlokovic, B. v. (2009). Neurovascular mechanisms and blood–brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *118*, 103–113.

- Ben Zablah, Y., Merovitch, N., & Jia, Z. (2020). The role of ADF/cofilin in synaptic physiology and Alzheimer's disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8*, 594998.
- Benedict, C., Brede, S., Schiöth, H. B., Lehnert, H., Schultes, B., Born, J., & Hallschmid, M. (2011). Intranasal insulin enhances postprandial thermogenesis and lowers postprandial serum insulin levels in healthy men. *Diabetes, 60*(1), 114–118.
- Bennett, D. A., Arnold, S. E., Valenzuela, M. J., Brayne, C., & Schneider, J. A. (2014). Cognitive and social lifestyle: links with neuropathology and cognition in late life. *Acta Neuropathologica, 127*, 137–150.
- Benoit, S. C., Air, E. L., Coolen, L. M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D. J., Seeley, R. J., & Woods, S. C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *Journal of Neuroscience, 22*(20), 9048–9052.
- Berger, J., & Moller, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annual Review of Medicine, 53*(1), 409–435.
- Berger, Z., Roder, H., Hanna, A., Carlson, A., Rangachari, V., Yue, M., Wszolek, Z., Ashe, K., Knight, J., & Dickson, D. (2007). Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *Journal of Neuroscience, 27*(14), 3650–3662.
- Bertrand, D., & Wallace, T. L. (2020). A review of the cholinergic system and therapeutic approaches to treat brain disorders. *Behavioral Pharmacology of the Cholinergic System*, 1–28.
- Bianchi, V. E. (2022). Impact of Testosterone on Alzheimer's Disease. *The World Journal of Men's Health, 40*(2), 243.
- Biessels, G.-J., Kamal, A., Urban, I. J. A., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W., & Gispen, W. H. (1998). Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Research, 800*(1), 125–135.
- Bilousova, T., Miller, C. A., Poon, W. W., Vinters, H. V., Corrada, M., Kawas, C., Hayden, E. Y., Teplow, D. B., Glabe, C., & Albay III, R. (2016). Synaptic amyloid- β oligomers precede p-Tau and differentiate high pathology control cases. *The American Journal of Pathology, 186*(1), 185–198.
- Birks, J. S., & Harvey, R. J. (2018). Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews, 6*.

- Bittner, T., Burgold, S., Dorostkar, M. M., Fuhrmann, M., Wegenast-Braun, B. M., Schmidt, B., Kretschmar, H., & Herms, J. (2012). Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. *Acta Neuropathologica*, *124*, 797–807.
- Bittner, T., Fuhrmann, M., Burgold, S., Ochs, S. M., Hoffmann, N., Mitteregger, G., Kretschmar, H., LaFerla, F. M., & Herms, J. (2010). Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PLoS One*, *5*(11), e15477.
- Blass, J. P., & Gibson, G. E. (1991). The role of oxidative abnormalities in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Revue Neurologique*, *147*(6–7), 513–525.
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *The Lancet*, *368*(9533), 387–403.
- Bliss, T. V. P., Collingridge, G. L., & Morris, R. G. M. (2003). Introduction. Long-term potentiation and structure of the issue. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *358*(1432), 607.
- Blutstein, T., & Haydon, P. G. (2014). The Tripartite Synapse: A Role for Glial Cells in Modulating Synaptic Transmission. In *The Synapse* (pp. 155–172). Elsevier.
- Bocarsly, M. E., Fasolino, M., Kane, G. A., LaMarca, E. A., Kirschen, G. W., Karatsoreos, I. N., McEwen, B. S., & Gould, E. (2015). Obesity diminishes synaptic markers, alters microglial morphology, and impairs cognitive function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(51), 15731–15736.
- Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. R. (2013). Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *39*(1), 3–18.
- Boghdadi, A. G., Teo, L., & Bourne, J. A. (2020). The neuroprotective role of reactive astrocytes after central nervous system injury. *Journal of Neurotrauma*, *37*(5), 681–691.
- Bohm, C., Chen, F., Sevalle, J., Qamar, S., Dodd, R., Li, Y., Schmitt-Ulms, G., Fraser, P. E., & St George-Hyslop, P. H. (2015). Current and future implications of basic and translational research on amyloid- β peptide production and removal pathways. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *66*, 3–11.
- Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Sathler, L. B., Brito-Moreira, J., Houzel, J.-C., Decker, H., Silverman, M. A., Kazi, H., Melo, H. M., & McClean, P. L. (2012). An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused

- by Alzheimer's disease-associated A β oligomers. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1339–1353.
- Bondareva, V. M., & Chistyakova, O. v. (2007). Insulin and insulin-receptor signaling in the brain. *Neurochemical Journal*, 1, 176–187.
- Bonilla-Quintana, M., Wörgötter, F., Tetzlaff, C., & Fauth, M. (2020). Modeling the shape of synaptic spines by their actin dynamics. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 9.
- Boros, B. D., Greathouse, K. M., Gearing, M., & Herskowitz, J. H. (2019). Dendritic spine remodeling accompanies Alzheimer's disease pathology and genetic susceptibility in cognitively normal aging. *Neurobiology of Aging*, 73, 92–103.
- Boros, B. D., Greathouse, K. M., Gentry, E. G., Curtis, K. A., Birchall, E. L., Gearing, M., & Herskowitz, J. H. (2017). Dendritic spines provide cognitive resilience against Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 82(4), 602–614.
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., & Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*, 82(2), 444–459.
- Bouzier-Sore, A.-K., & Pellerin, L. (2013). Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 179.
- Bove, R., Secor, E., Chibnik, L. B., Barnes, L. L., Schneider, J. A., Bennett, D. A., & De Jager, P. L. (2014). Age at surgical menopause influences cognitive decline and Alzheimer pathology in older women. *Neurology*, 82(3), 222–229.
- Brady, M. J. (2004). IRS2 takes center stage in the development of type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(7), 886–888.
- Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauça, M., & Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 137(1), 354–366.
- Bromander, S., Anckarsäter, R., Ahrén, B., Kristiansson, M., Blennow, K., Holmäng, A., Zetterberg, H., Anckarsäter, H., & Wass, C. E. (2010). Cerebrospinal fluid insulin during non-neurological surgery. *Journal of Neural Transmission*, 117, 1167–1170.
- Brown, G. C., & Bal-Price, A. (2003). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Molecular Neurobiology*, 27, 325–355.

Buck, E., Gokhale, P. C., Koujak, S., Brown, E., Eyzaguirre, A., Tao, N., Rosenfeld-Franklin, M., Lerner, L., Chiu, M. I., & Wild, R. (2010). Compensatory insulin receptor (IR) activation on inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R): rationale for cotargeting IGF-1R and IR in cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(10), 2652–2664.

Bullock, R. (2005). Treatment of behavioural and psychiatric symptoms in dementia: implications of recent safety warnings. *Current Medical Research and Opinion*, 21(1), 1–10.

Burke, L. M., Whitfield, J., Heikura, I. A., Ross, M. L. R., Tee, N., Forbes, S. F., Hall, R., McKay, A. K. A., Wallett, A. M., & Sharma, A. P. (2021). Adaptation to a low carbohydrate high fat diet is rapid but impairs endurance exercise metabolism and performance despite enhanced glycogen availability. *The Journal of Physiology*, 599(3), 771–790.

C

Cabrera-Pastor, A., Llansola, M., Montoliu, C., Malaguarnera, M., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., García-García, R., Mangas-Losada, A., Izquierdo-Altarejos, P., & Arenas, Y. M. (2019). Peripheral inflammation induces neuroinflammation that alters neurotransmission and cognitive and motor function in hepatic encephalopathy: Underlying mechanisms and therapeutic implications. *Acta Physiologica*, 226(2), e13270.

Caffino, L., Mottarlini, F., & Fumagalli, F. (2020). Born to protect: leveraging BDNF against cognitive deficit in Alzheimer's disease. *CNS Drugs*, 34(3), 281–297.

Cai, D., Dhe-Paganon, S., Melendez, P. A., Lee, J., & Shoelson, S. E. (2003). Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25323–25330.

Cai, Z., Hussain, M. D., & Yan, L.-J. (2014). Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience*, 124(5), 307–321.

Cai, Z., Xiao, M., Chang, L., & Yan, L.-J. (2015). Role of insulin resistance in Alzheimer's disease. *Metabolic Brain Disease*, 30, 839–851.

Calsolaro, V., & Edison, P. (2016). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Alzheimer's & Dementia*, 12(6), 719–732.

Campdelacreu, J. (2014). Parkinson's disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. *Neurología (English Edition)*, 29(9), 541–549.

- Cao, Z., Yang, X., Zhang, H., Wang, H., Huang, W., Xu, F., Zhuang, C., Wang, X., & Li, Y. (2016). Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat. *Chemosphere*, *151*, 289–295.
- Cárdenas-Aguayo, M. del C., Gómez-Virgilio, L., DeRosa, S., & Meraz-Ríos, M. A. (2014). The role of tau oligomers in the onset of Alzheimer's disease neuropathology. *ACS Chemical Neuroscience*, *5*(12), 1178–1191.
- Carmo Carreiras, M., Mendes, E., Jesus Perry, M., Paula Francisco, A., & Marco-Contelles, J. (2013). The multifactorial nature of Alzheimer's disease for developing potential therapeutics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *13*(15), 1745–1770.
- Carocci, A., Catalano, A., Sinicropi, M. S., & Genchi, G. (2018). Oxidative stress and neurodegeneration: the involvement of iron. *Biometals*, *31*, 715–735.
- Caruso, M. A., & Sheridan, M. A. (2011). New insights into the signaling system and function of insulin in fish. *General and Comparative Endocrinology*, *173*(2), 227–247.
- Carvajal Carvajal, C. (2015). Productos finales de glicación (AGES) y la nefropatía diabética. *Medicina Legal de Costa Rica*, *32*(1), 154–160.
- Carvajal, K., de La Luz Hernández-Esquivel, M., & Moreno-Sánchez, R. (2007). PPARs, síndrome metabólico y enfermedad cardíaca. In *Archivos de Cardiología de México* (Vol. 77, Issue S4).
- Carvalho, K. M., Winter, E., & de Souza Antunes, A. M. (2015). Analysis of technological developments in the treatment of Alzheimer's disease through patent documents. *Intelligent Information Management*, *7*(05), 268.
- Cashion, M. F., Banks, W. A., & Kastin, A. J. (1996). Sequestration of centrally administered insulin by the brain: effects of starvation, aluminum, and TNF- α . *Hormones and Behavior*, *30*(3), 280–286.
- Caudal, L. C., Gobbo, D., Scheller, A., & Kirchhoff, F. (2020). The paradox of astroglial Ca²⁺ signals at the interface of excitation and inhibition. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 609947.
- Chabrier, M. A., Cheng, D., Castello, N. A., Green, K. N., & LaFerla, F. M. (2014). Synergistic effects of amyloid-beta and wild-type human tau on dendritic spine loss in a floxed double transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *64*, 107–117.

- Chakrabarty, P., Li, A., Ladd, T. B., Strickland, M. R., Koller, E. J., Burgess, J. D., Funk, C. C., Cruz, P. E., Allen, M., & Yaroshenko, M. (2018). TLR5 decoy receptor as a novel anti-amyloid therapeutic for Alzheimer's disease. *Journal of Experimental Medicine*, *215*(9), 2247–2264.
- Charles, A. C., Merrill, J. E., Dirksen, E. R., & Sandersont, M. J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*, *6*(6), 983–992.
- Chasseigneaux, S., Dinc, L., Rose, C., Chabret, C., Coulpier, F., Topilko, P., Mauger, G., & Allinquant, B. (2011). Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein α induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. *PLoS One*, *6*(1), e16301.
- Chazeau, A., Mehidi, A., Nair, D., Gautier, J. J., Leduc, C., Chamma, I., Kage, F., Kechkar, A., Thoumine, O., & Rottner, K. (2014). Nanoscale segregation of actin nucleation and elongation factors determines dendritic spine protrusion. *The EMBO Journal*, *33*(23), 2745–2764.
- Chehaibi, K., Le Maire, L., Bradoni, S., Escola, J. C., Blanco-Vaca, F., & Slimane, M. N. (2017). Effect of PPAR- β/δ agonist GW0742 treatment in the acute phase response and blood–brain barrier permeability following brain injury. *Translational Research*, *182*, 27–48.
- Chelini, G., Pantazopoulos, H., Durning, P., & Berretta, S. (2018). The tetrapartite synapse: a key concept in the pathophysiology of schizophrenia. *European Psychiatry*, *50*, 60–69.
- Chen, T., Wang, D., & Chen, S. (2009). Amyloid- β interrupts the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway that could be involved in brain-derived neurotrophic factor-induced Arc expression in rat cortical neurons. *Journal of Neuroscience Research*, *87*(10), 2297–2307.
- Chen, W., Zhang, X. I. A., & Huang, W. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Molecular Medicine Reports*, *13*(4), 3391–3396.
- Chen, Y., Run, X., Liang, Z., Zhao, Y., Dai, C., Iqbal, K., Liu, F., & Gong, C.-X. (2014). Intranasal insulin prevents anesthesia-induced hyperphosphorylation of tau in 3xTg-AD mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *6*, 100.
- Cheng, W., Chen, W., Wang, P., & Chu, J. (2018). Asiatic acid protects differentiated PC12 cells from A β 25–35-induced apoptosis and tau hyperphosphorylation via regulating PI3K/Akt/GSK-3 β signaling. *Life Sciences*, *208*, 96–101.

- Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., Manivasagam, T., Thenmozhi, A. J., Essa, M. M., Guillemin, G. J., Chandra, R., & Sakharkar, M. K. (2019). Dendritic spines: Revisiting the physiological role. In *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* (Vol. 92, pp. 161–193).
- Chiu, S.-L., Chen, C.-M., & Cline, H. T. (2008). Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. *Neuron*, *58*(5), 708–719.
- Chiu, S.-L., & Cline, H. T. (2010). Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Development*, *5*, 1–18.
- Chowers, I., Lavy, S., & Halpern, L. (1961). Effect of insulin administered intracisternally in dogs on the glucose level of the blood and the cerebrospinal fluid. *Experimental Neurology*, *3*(2), 197–205.
- Chowers, I., Lavy, S., & Halpern, L. (1966). Effect of insulin administered intracisternally on the glucose level of the blood and the cerebrospinal fluid in vagotomized dogs. *Experimental Neurology*, *14*(3), 383–389.
- Christofides, A., Konstantinidou, E., Jani, C., & Boussiotis, V. A. (2021). The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism*, *114*, 154338.
- Chunchai, T., Thunapong, W., Yasom, S., Wanchai, K., Eaimworawuthikul, S., Metzler, G., Lungkaphin, A., Pongchaidecha, A., Sirilun, S., & Chaiyasut, C. (2018). Decreased microglial activation through gut-brain axis by prebiotics, probiotics, or synbiotics effectively restored cognitive function in obese-insulin resistant rats. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 1–15.
- Citron, M. (2004). β -Secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease—promise and challenge. *Trends in Pharmacological Sciences*, *25*(2), 92–97.
- Cline, E. N., Bicca, M. A., Viola, K. L., & Klein, W. L. (2018). The amyloid- β oligomer hypothesis: beginning of the third decade. *Journal of Alzheimer's Disease*, *64*(s1), S567–S610.
- Clodfelder-Miller, B. J., Zmijewska, A. A., Johnson, G. V. W., & Jope, R. S. (2006). Tau is hyperphosphorylated at multiple sites in mouse brain in vivo after streptozotocin-induced insulin deficiency. *Diabetes*, *55*(12), 3320–3325.
- Coimbra, J. R. M., Marques, D. F. F., Baptista, S. J., Pereira, C. M. F., Moreira, P. I., Dinis, T. C. P., Santos, A. E., & Salvador, J. A. R. (2018). Highlights in BACE1 inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Frontiers in Chemistry*, *6*, 178.

- Coley, A. A., & Gao, W.-J. (2018). PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *82*, 187–194.
- Collingridge, G. L., Peineau, S., Howland, J. G., & Wang, Y. T. (2010). Long-term depression in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(7), 459–473.
- Congdon, E. E., & Sigurdsson, E. M. (2018). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, *14*(7), 399–415.
- Conget, I. (2002). Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Revista Española de Cardiología*, *55*(5), 528–535.
- Corbett, G. T., Gonzalez, F. J., & Pahan, K. (2015). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor α stimulates ADAM10-mediated proteolysis of APP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(27), 8445–8450.
- Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., & Smith, S. J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, *247*(4941), 470–473.
- Cortés, N., Andrade, V., Guzmán-Martínez, L., Estrella, M., & Maccioni, R. B. (2018). Neuroimmune tau mechanisms: their role in the progression of neuronal degeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4), 956.
- Counts, S. E., He, B., Nadeem, M., Wu, J., Scheff, S. W., & Mufson, E. J. (2012). Hippocampal drebrin loss in mild cognitive impairment. *Neurodegenerative Diseases*, *10*(1–4), 216–219.
- Craft, S. (2005). Insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease: age- and obesity-related effects on memory, amyloid, and inflammation. *Neurobiology of Aging*, *26*(1), 65–69.
- Crismon, M. L. (1994). Tacrine: first drug approved for Alzheimer's disease. *Annals of Pharmacotherapy*, *28*(6), 744–751.
- Croteau, E., Castellano, C. A., Fortier, M., Bocti, C., Fulop, T., Paquet, N., & Cunnane, S. C. (2018). A cross-sectional comparison of brain glucose and ketone metabolism in cognitively healthy older adults, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, *107*, 18–26.
- Crous-Bou, M., Minguillón, C., Gramunt, N., & Molinuevo, J. L. (2017). Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimer's Research & Therapy*, *9*, 1–9.

- Cumbo, E., & Ligorì, L. D. (2014). Differential effects of current specific treatments on behavioral and psychological symptoms in patients with Alzheimer's disease: a 12-month, randomized, open-label trial. *Journal of Alzheimer's Disease*, *39*(3), 477–485.
- Cummings, J., Aisen, P., Apostolova, L. G., Atri, A., Salloway, S., & Weiner, M. (2021). Aducanumab: appropriate use recommendations. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, *8*, 398–410.
- Cummings, J. L., & Cole, G. (2002). Alzheimer disease. *Jama*, *287*(18), 2335–2338.
- Cunnane, S., Nugent, S., Roy, M., Courchesne-Loyer, A., Croteau, E., Tremblay, S., Castellano, A., Pifferi, F., Bocti, C., & Paquet, N. (2011). Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition*, *27*(1), 3–20.
- Cuttler, K., Hassan, M., Carr, J., Cloete, R., & Bardien, S. (2021). Emerging evidence implicating a role for neurexins in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. *Open Biology*, *11*(10), 210091.

D

- Dallérac, G., Zapata, J., & Rouach, N. (2018). Versatile control of synaptic circuits by astrocytes: where, when and how? *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(12), 729–743.
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, *65*(1), 1–105.
- Danysz, W., & Parsons, C. G. (2003). The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, *18*(S1), S23–S32.
- Das, R., Balmik, A. A., & Chinnathambi, S. (2020). Melatonin reduces GSK3 β -mediated Tau phosphorylation, enhances Nrf2 nuclear translocation and anti-inflammation. *ASN Neuro*, *12*, 1759091420981204.
- Das, T. K., Jana, P., Chakrabarti, S. K., & Abdul Hamid, M. R. W. (2019). Curcumin downregulates GSK3 and Cdk5 in scopolamine-induced Alzheimer's disease rats abrogating A β 40/42 and tau hyperphosphorylation. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, *3*(1), 257–267.
- Davies, P., Katzman, R., & Terry, R. D. (1980). Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementia. *Nature*, *288*, 279–280.

- Davies, P., & Maloney, A. J. F. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *The Lancet*, *308*(8000), 1403.
- Davis, K. L., Mohs, R. C., Marin, D., Purohit, D. P., Perl, D. P., Lantz, M., Austin, G., & Haroutunian, V. (1999). Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *Jama*, *281*(15), 1401–1406.
- Dawkins, E., & Small, D. H. (2014). Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *129*(5), 756–769.
- De Felice, F. G., & Benedict, C. (2015). A key role of insulin receptors in memory. *Diabetes*, *64*(11), 3653–3655.
- De Ferrari, G. V, Canales, M. A., Shin, I., Weiner, L. M., Silman, I., & Inestrosa, N. C. (2001). A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid β -peptide fibril formation. *Biochemistry*, *40*(35), 10447–10457.
- de la Monte, S. M., Tong, M., Schiano, I., & Didsbury, J. (2017). Improved brain insulin/IGF signaling and reduced neuroinflammation with T3D-959 in an experimental model of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *55*(2), 849–864.
- de la Monte, S. M., & Wands, J. R. (2006). Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *9*(2), 167–181.
- De Meyts, P. (2016). The insulin receptor and its signal transduction network. *Endotext [Internet]*.
- De Santi, S., de Leon, M. J., Rusinek, H., Convit, A., Tarshish, C. Y., Roche, A., Tsui, W. H., Kandil, E., Boppana, M., & Daisley, K. (2001). Hippocampal formation glucose metabolism and volume losses in MCI and AD. *Neurobiology of Aging*, *22*(4), 529–539.
- De Sousa, R. A. L. (2022). Reactive gliosis in Alzheimer's disease: a crucial role for cognitive impairment and memory loss. *Metabolic Brain Disease*, *37*(4), 851–857.
- De Sousa, R. A. L., Harmer, A. R., Freitas, D. A., Mendonça, V. A., Lacerda, A. C. R., & Leite, H. R. (2020). An update on potential links between type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Molecular Biology Reports*, *47*, 6347–6356.
- de Wilde, M. C., Vellas, B., Girault, E., Yavuz, A. C., & Sijben, J. W. (2017). Lower brain and blood nutrient status in Alzheimer's disease: Results from meta-analyses.

- Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 3(3), 416–431.
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., & Shulman, G. I. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 1–22.
- Dekeryte, R., Franklin, Z., Hull, C., Croce, L., Kamli-Salino, S., Helk, O., Hoffmann, P. A., Yang, Z., Riedel, G., & Delibegovic, M. (2021). The BACE1 inhibitor LY2886721 improves diabetic phenotypes of BACE1 knock-in mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1867(7), 166149.
- DeKosky, S. T., Ikonomic, M. D., Styren, S. D., Beckett, L., Wisniewski, S., Bennett, D. A., Cochran, E. J., Kordower, J. H., & Mufson, E. J. (2002). Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 51(2), 145–155.
- Delpont, A., & Hewer, R. (2022). The amyloid precursor protein: A converging point in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 59(7), 4501–4516.
- Deng, Y., Wei, J., Cheng, J., Zhong, P., Xiong, Z., Liu, A., Lin, L., Chen, S., & Yan, Z. (2016). Partial amelioration of synaptic and cognitive deficits by inhibiting cofilin dephosphorylation in an animal model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 53(4), 1419–1432.
- Dening, T., & Sandilyan, M. B. (2015). Dementia: definitions and types. *Nursing Standard (2014+)*, 29(37), 37.
- Derakhshan, F., & Toth, C. (2013). Insulin and the brain. *Current Diabetes Reviews*, 9(2), 102–116.
- DeTure, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), 1–18.
- Dhillon, S. (2021). Aducanumab: first approval. *Drugs*, 81, 1437–1443.
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, 139, 136–153.
- Dityatev, A., & Rusakov, D. A. (2011). Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(2), 353–359.

- Dityatev, A., Schachner, M., & Sonderegger, P. (2010). The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(11), 735–746.
- Dong, X., Jiang, H., Li, S., & Zhang, D. (2021). Low serum testosterone concentrations are associated with poor cognitive performance in older men but not women. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*, 712237.
- Dorostkar, M. M., Zou, C., Blazquez-Llorca, L., & Herms, J. (2015). Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathologica*, *130*, 1–19.
- Doruk, H., Naharci, M. I., Bozoglu, E., Isik, A. T., & Kilic, S. (2010). The relationship between body mass index and incidental mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and Vascular Dementia in elderly. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, *14*, 834–838.
- Dou, K.-X., Tan, M.-S., Tan, C.-C., Cao, X.-P., Hou, X.-H., Guo, Q.-H., Tan, L., Mok, V., & Yu, J.-T. (2018). Comparative safety and effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: a network meta-analysis of 41 randomized controlled trials. *Alzheimer's Research & Therapy*, *10*(1), 1–10.
- Du, H., Chen, X., Zhang, L., Liu, Y., Zhan, C., Chen, J., Wang, H., Yu, Z., & Liang, C. (2020). Experimental autoimmune prostatitis induces learning-memory impairment and structural neuroplastic changes in mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *40*, 99–111.
- Du, L., Zhang, Y., Chen, Y., Zhu, J., Yang, Y., & Zhang, H.-L. (2017). Role of microglia in neurological disorders and their potentials as a therapeutic target. *Molecular Neurobiology*, *54*(10), 7567–7584.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Cummings, J. L., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Delacourte, A., Frisoni, G., Fox, N. C., & Galasko, D. (2010). Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *The Lancet Neurology*, *9*(11), 1118–1127.
- Dumitriu, D., Hao, J., Hara, Y., Kaufmann, J., Janssen, W. G. M., Lou, W., Rapp, P. R., & Morrison, J. H. (2010). Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *Journal of Neuroscience*, *30*(22), 7507–7515.
- Dun, X., & Chilton, J. K. (2010). Control of cell shape and plasticity during development and disease by the actin-binding protein Drebrin. *Histology and Histopathology*.

Dvorkin, R., & Ziv, N. E. (2016). Relative contributions of specific activity histories and spontaneous processes to size remodeling of glutamatergic synapses. *PLoS Biology*, *14*(10), e1002572.

E

Egan, M. F., Kost, J., Tariot, P. N., Aisen, P. S., Cummings, J. L., Vellas, B., Sur, C., Mukai, Y., Voss, T., & Furtek, C. (2018). Randomized trial of verubecestat for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, *378*(18), 1691–1703.

Egan, M. F., Mukai, Y., Voss, T., Kost, J., Stone, J., Furtek, C., Mahoney, E., Cummings, J. L., Tariot, P. N., & Aisen, P. S. (2019). Further analyses of the safety of verubecestat in the phase 3 EPOCH trial of mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, *11*(1), 1–12.

Eikelenboom, P., van Exel, E., Hoozemans, J. J. M., Veerhuis, R., Rozemuller, A. J. M., & van Gool, W. A. (2010). Neuroinflammation—an early event in both the history and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Diseases*, *7*(1–3), 38–41.

Eikelenboom, P., Veerhuis, R., Scheper, W., Rozemuller, A. J. M., van Gool, W. A., & Hoozemans, J. J. M. (2006). The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, *113*, 1685–1695.

El Khoury, N. B., Gratuze, M., Papon, M.-A., Bretteville, A., & Planel, E. (2014). Insulin dysfunction and Tau pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 22.

Elbrecht, A., Chen, Y., Cullinan, C. A., Hayes, N., Leibowitz, M. D., Moller, D. E., & Berger, J. (1996). Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors γ 1 and γ 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *224*(2), 431–437.

Elson, G. N., & DeFelipe, J. (2002). Spine distribution in cortical pyramidal cells: a common organizational principle across species. *Progress in Brain Research*, *136*, 109–133.

English, C. (2012). Donepezil 23 mg: Is it more advantageous compared to the original? *Mental Health Clinician*, *1*(11), 272–273.

Erusalimsky, J. D. (2021). The use of the soluble receptor for advanced glycation-end products (sRAGE) as a potential biomarker of disease risk and adverse outcomes. *Redox Biology*, *42*, 101958.

- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., & Ward, P. J. (1990). Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*, *248*(4959), 1122–1124.
- Eshkoor, S. A., Hamid, T. A., Mun, C. Y., & Ng, C. K. (2015). Mild cognitive impairment and its management in older people. *Clinical Interventions in Aging*, 687–693.
- Espeseth, A. S., Xu, M., Huang, Q., Coburn, C. A., Jones, K. L. G., Ferrer, M., Zuck, P. D., Strulovici, B., Price, E. A., & Wu, G. (2005). Compounds that bind APP and inhibit A β processing in vitro suggest a novel approach to Alzheimer disease therapeutics. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(18), 17792–17797.
- Ettcheto, M., Busquets, O., Cano, A., Sanchez-Lopez, E., Manzine, P. R., Espinosa-Jimenez, T., Verdaguer, E., Sureda, F. X., Olloquequi, J., & Castro-Torres, R. D. (2021). Pharmacological strategies to improve dendritic spines in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *82*(s1), S91–S107.
- F**
- Fakhoury, M. (2018). Microglia and astrocytes in Alzheimer's disease: implications for therapy. *Current Neuropharmacology*, *16*(5), 508–518.
- Farkhondeh, T., Forouzanfar, F., Roshanravan, B., & Samarghandian, S. (2019). Curcumin effect on non-amyloidogenic pathway for preventing alzheimer's disease. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *9*(4).
- Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., & De Felice, F. G. (2015). Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 191.
- Ferry, C. P., Prince, M., & Brayne, C. (2005). Alzheimer's Disease International Global prevalence of dementia: a Delphi consensus Study. *Lancet*, *366*(9503), 2112–2117.
- Fifkov, E. (1985). Actin in the nervous system. *Brain Research Reviews*, *9*(2), 187–215.
- Figlewicz, D. P. (2003). Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *284*(4), R882–R892.
- Fishel, M. A., Watson, G. S., Montine, T. J., Wang, Q., Green, P. S., Kulstad, J. J., Cook, D. G., Peskind, E. R., Baker, L. D., & Goldgaber, D. (2005). Hyperinsulinemia provokes synchronous increases in central inflammation and β -amyloid in normal adults. *Archives of Neurology*, *62*(10), 1539–1544.

- Forero, D. A., López-León, S., González-Giraldo, Y., Dries, D. R., Pereira-Morales, A. J., Jiménez, K. M., & Franco-Restrepo, J. E. (2018). APOE gene and neuropsychiatric disorders and endophenotypes: A comprehensive review. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, *177*(2), 126–142.
- Fourrier, C., Singhal, G., & Baune, B. T. (2019). Neuroinflammation and cognition across psychiatric conditions. *CNS Spectrums*, *24*(1), 4–15.
- Frame, S., & Zheleva, D. (2006). Targeting glycogen synthase kinase-3 in insulin signalling. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *10*(3), 429–444.
- Francis, G. J., Martinez, J. A., Liu, W. Q., Xu, K., Ayer, A., Fine, J., Tuor, U. I., Glazner, G., Hanson, L. R., & Frey, W. H. (2008). Intranasal insulin prevents cognitive decline, cerebral atrophy and white matter changes in murine type I diabetic encephalopathy. *Brain*, *131*(12), 3311.
- Frank-Cannon, T. C., Alto, L. T., McAlpine, F. E., & Tansey, M. G. (2009). Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Molecular Neurodegeneration*, *4*, 1–13.
- Frankiewicz, T., & Parsons, C. G. (1999). Memantine restores long term potentiation impaired by tonic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation following reduction of Mg²⁺ in hippocampal slices. *Neuropharmacology*, *38*(9), 1253–1259.
- Frost, G. R., & Li, Y.-M. (2017). The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biology*, *7*(12), 170228.
- Fuentes, F., Zimmer, D., Atienza, M., Schottenfeld, J., Penkala, I., Bale, T., Bence, K. K., & Arregui, C. O. (2012). Protein tyrosine phosphatase PTP1B is involved in hippocampal synapse formation and learning. *PLoS One*, *7*(7), e41536.
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols in Pharmacology*, *70*(1), 5–47.
- Furukawa, K., Barger, S. W., Blalock, E. M., & Mattson, M. P. (1996). Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted β -amyloid-precursor protein. *Nature*, *379*(6560), 74–78.

G

- Gabbouj, S., Ryhänen, S., Marttinen, M., Wittrahm, R., Takalo, M., Kemppainen, S., Martiskainen, H., Tanila, H., Haapasalo, A., & Hiltunen, M. (2019). Altered insulin signaling in Alzheimer's disease brain—special emphasis on PI3K-Akt pathway. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 629.

- Galdeano, C., Viayna, E., Sola, I., Formosa, X., Camps, P., Badia, A., Clos, M. V., Relat, J., Ratia, M., & Bartolini, M. (2012). Huprine–tacrine heterodimers as anti-amyloidogenic compounds of potential interest against Alzheimer’s and prion diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, *55*(2), 661–669.
- Games, D., Buttini, M., Kobayashi, D., Schenk, D., & Seubert, P. (2006). Mice as models: transgenic approaches and Alzheimer’s disease. *Journal of Alzheimer’s Disease*, *9*(s3), 133–149.
- Garcia-Alloza, M., Borrelli, L. A., Hyman, B. T., & Bacskai, B. J. (2010). Antioxidants have a rapid and long-lasting effect on neuritic abnormalities in APP: PS1 mice. *Neurobiology of Aging*, *31*(12), 2058–2068.
- Garwood, C. J., Ratcliffe, L. E., Simpson, J. E., Heath, P. R., Ince, P. G., & Wharton, S. B. (2017). astrocytes in Alzheimer’s disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *43*(4), 281–298.
- Gasparini, L., Gouras, G. K., Wang, R., Gross, R. S., Beal, M. F., Greengard, P., & Xu, H. (2001). Stimulation of β -amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal β -amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Neuroscience*, *21*(8), 2561–2570.
- Gasparini, L., Netzer, W. J., Greengard, P., & Xu, H. (2002). Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer’s disease? *Trends in Pharmacological Sciences*, *23*(6), 288–293.
- Gebicke-Haerter, P. J., Van Calker, D., Nörenberg, W., & Illes, P. (1996). Molecular mechanisms of microglial activation. A. Implications for regeneration and neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International*, *29*(1), 1–12.
- Gerzon, K., Krumkalns, E. V, Brindle, R. L., Marshall, F. J., & Root, M. A. (1963). The adamantyl group in medicinal agents. I. Hypoglycemic N-arylsulfonyl-N'-adamantylureas. *Journal of Medicinal Chemistry*, *6*(6), 760–763.
- Ghasemi, R., Haeri, A., Dargahi, L., Mohamed, Z., & Ahmadiani, A. (2013). Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Molecular Neurobiology*, *47*, 145–171.
- Giaume, C., Kirchhoff, F., Matute, C., Reichenbach, A., & Verkhratsky, A. (2007). Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death & Differentiation*, *14*(7), 1324–1335.
- Gilmor, M. L., Erickson, J. D., Varoqui, H., Hersh, L. B., Bennett, D. A., Cochran, E. J., Mufson, E. J., & Levey, A. I. (1999). Preservation of nucleus basalis neurons containing choline acetyltransferase and the vesicular acetylcholine transporter

- in the elderly with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Journal of Comparative Neurology*, 411(4), 693–704.
- Giri, M., Zhang, M., & Lü, Y. (2016). Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clinical Interventions in Aging*, 665–681.
- Goedert, M. (2018). Tau filaments in neurodegenerative diseases. *FEBS Letters*, 592(14), 2383–2391.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3(4), 519–526.
- Gold, M., & El Khoury, J. (2015). β -amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease. *Seminars in Immunopathology*, 37, 607–611.
- Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Cuadros, R., Hernández, F., & Avila, J. (2006). Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Letters*, 580(20), 4842–4850.
- Gong, C.-X., & Iqbal, K. (2008). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Current Medicinal Chemistry*, 15(23), 2321–2328.
- Gong, C.-X., Liu, F., & Iqbal, K. (2018). Multifactorial hypothesis and multi-targets for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(s1), S107–S117.
- Gorantla, N. V., & Chinnathambi, S. (2018). Tau protein squired by molecular chaperones during Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 66, 356–368.
- Graham, L. C., Harder, J. M., Soto, I., de Vries, W. N., John, S. W. M., & Howell, G. R. (2016). Chronic consumption of a western diet induces robust glial activation in aging mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 6(1), 1–13.
- Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual Review of Immunology*, 29, 415–445.
- Griffiths, J., & Grant, S. G. N. (2022). Synapse pathology in Alzheimer's disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
- Grutzendler, J., Kasthuri, N., & Gan, W.-B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, 420(6917), 812–816.

- Grygiel-Górniak, B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications-a review. *Nutrition Journal*, *13*, 1–10.
- Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., & Ihara, Y. (2001). Distinct intramembrane cleavage of the β -amyloid precursor protein family resembling γ -secretase-like cleavage of Notch. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(38), 35235–35238.
- Guerra, J. J. L., Arjona, L. G., & Marante, J. P. D. (2014). Demencias y enfermedad de Alzheimer un recorrido por la historia. *GerolInfo*, *9*(1).
- Guo, T., Noble, W., & Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica*, *133*, 665–704.
- Guzman-Martinez, L., Maccioni, R. B., Andrade, V., Navarrete, L. P., Pastor, M. G., & Ramos-Escobar, N. (2019). Neuroinflammation as a common feature of neurodegenerative disorders. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 1008.

H

- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(5), a006270.
- Halassa, M. M., Fellin, T., & Haydon, P. G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, *13*(2), 54–63.
- Halassa, M. M., & Haydon, P. G. (2010). Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annual Review of Physiology*, *72*, 335–355.
- Hall, C. M., Moeendarbary, E., & Sheridan, G. K. (2021). Mechanobiology of the brain in ageing and Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, *53*(12), 3851–3878.
- Hempel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., & Snyder, P. J. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, *141*(7), 1917–1933.
- Hempel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Farlow, M. R., Snyder, P. J., Giacobini, E., Khachaturian, Z. S., & Cholinergic System Working Group, and for the A. P. M. I. (APMI). (2019). Revisiting the cholinergic

- hypothesis in Alzheimer's disease: emerging evidence from translational and clinical research. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 6, 2–15.
- Hampton, D. W., Webber, D. J., Bilican, B., Goedert, M., Spillantini, M. G., & Chandran, S. (2010). Cell-mediated neuroprotection in a mouse model of human tauopathy. *Journal of Neuroscience*, 30(30), 9973–9983.
- Han, Y., Huang, Y., & Sheng, C. (2018). Dissection of prodromal Alzheimer's disease. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 23(7), 1272–1291.
- Hao, S., Dey, A., Yu, X., & Stranahan, A. M. (2016). Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 51, 230–239.
- Harada, K., Kamiya, T., & Tsuboi, T. (2016). Gliotransmitter release from astrocytes: functional, developmental, and pathological implications in the brain. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 499.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356.
- Harry, G. J., & Kraft, A. D. (2008). Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(10), 1265–1277.
- Hauser, P. S., Narayanaswami, V., & Ryan, R. O. (2011). Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 62–74.
- Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J., & Brownstein, M. (1978). Identification of insulin in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(11), 5737–5741.
- Hays, S. J. (1998). Therapeutic approaches to the treatment of neuroinflammatory diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 4(4), 335–348.
- Hebert, L. E., Scherr, P. A., McCann, J. J., Beckett, L. A., & Evans, D. A. (2001). Is the risk of developing Alzheimer's disease greater for women than for men? *American Journal of Epidemiology*, 153(2), 132–136.
- Heiss, W. D., Szelies, B., Kessler, J., & Herholz, K. (1991). Abnormalities of energy metabolism in Alzheimer's disease studied with PET. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 640, 65–71.

- Heni, M., Wagner, R., Kullmann, S., Veit, R., Mat Husin, H., Linder, K., Benkendorff, C., Peter, A., Stefan, N., & Häring, H.-U. (2014). Central insulin administration improves whole-body insulin sensitivity via hypothalamus and parasympathetic outputs in men. *Diabetes*, *63*(12), 4083–4088.
- Herms, J., & Dorostkar, M. M. (2016). Dendritic spine pathology in neurodegenerative diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *11*, 221–250.
- Hernández, F., de Barreda, E. G., Fuster-Matanzo, A., Lucas, J. J., & Avila, J. (2010). GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Experimental Neurology*, *223*(2), 322–325.
- Herrup, K. (2010). Reimagining Alzheimer's disease—an age-based hypothesis. *Journal of Neuroscience*, *30*(50), 16755–16762.
- Hesse, R., von Einem, B., Wagner, F., Bott, P., Schwanzar, D., Jackson, R. J., Föhr, K. J., Lausser, L., Kroker, K. S., & Proepper, C. (2018). sAPP β and sAPP α increase structural complexity and E/I input ratio in primary hippocampal neurons and alter Ca²⁺ homeostasis and CREB1-signaling. *Experimental Neurology*, *304*, 1–13.
- Hickman, S. E., Allison, E. K., & el Khoury, J. (2008). Microglial dysfunction and defective β -amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroscience*, *28*(33), 8354–8360.
- Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L., Means, T. K., & El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, *16*(12), 1896–1905.
- Hisanaga, S., Krishnankutty, A., & Kimura, T. (2022). In vivo analysis of the phosphorylation of tau and the tau protein kinases Cdk5-p35 and GSK3 β by using Phos-tag SDS-PAGE. *Journal of Proteomics*, *262*, 104591.
- Ho, L., Qin, W., Pompl, P. N., Xiang, Z., Wang, J., Zhao, Z., Peng, Y., Cambareri, G., Rocher, A., & Mobbs, C. V. (2004). Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, *18*(7), 902–904.
- Hoek, R. M., Ruuls, S. R., Murphy, C. A., Wright, G. J., Goddard, R., Zurawski, S. M., Blom, B., Homola, M. E., Streit, W. J., & Brown, M. H. (2000). Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*, *290*(5497), 1768–1771.

- Holtmaat, A., & Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(9), 647–658.
- Holzgrave, U., Kapková, P., Alptüzün, V., Scheiber, J., & Kugelmann, E. (2007). Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *11*(2), 161–179.
- Hong, H., Kim, B. S., & Im, H.-I. (2016). Pathophysiological role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *International Neuropsychology Journal*, *20*(Suppl 1), S2.
- Hong, M., & Lee, V. M.-Y. (1997). Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(31), 19547–19553.
- Hooijmans, C. R., Graven, C., Dederen, P. J., Tanila, H., van Groen, T., & Kiliaan, A. J. (2007). Amyloid beta deposition is related to decreased glucose transporter-1 levels and hippocampal atrophy in brains of aged APP/PS1 mice. *Brain Research*, *1181*, 93–103.
- Hooper, C., Killick, R., & Lovestone, S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *104*(6), 1433–1439.
- Hotulainen, P., & Hoogenraad, C. C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *Journal of Cell Biology*, *189*(4), 619–629.
- Howarth, C., Gleeson, P., & Attwell, D. (2012). Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *32*(7), 1222–1232.
- Howes, M.-J. R., Fang, R., & Houghton, P. J. (2017). Effect of Chinese herbal medicine on Alzheimer's disease. *International Review of Neurobiology*, *135*, 29–56.
- Hoy, S. M. (2023). Lecanemab: First Approval. *Drugs*, 1–7.
- Hoyer, S. (2004). Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *European Journal of Pharmacology*, *490*(1–3), 115–125.
- Hsia, A. Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G.-Q., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Malenka, R. C., Nicoll, R. A., & Mucke, L. (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(6), 3228–3233.

Hu, W., Zhang, X., Tung, Y. C., Xie, S., Liu, F., & Iqbal, K. (2016). Hyperphosphorylation determines both the spread and the morphology of tau pathology. *Alzheimer's & Dementia*, *12*(10), 1066–1077.

Huang, C.-C., Chung, C.-M., Leu, H.-B., Lin, L.-Y., Chiu, C.-C., Hsu, C.-Y., Chiang, C.-H., Huang, P.-H., Chen, T.-J., & Lin, S.-J. (2014). Diabetes mellitus and the risk of Alzheimer's disease: a nationwide population-based study. *PLoS One*, *9*(1), e87095.

Huang, C.-C., Lee, C.-C., & Hsu, K.-S. (2010). The role of insulin receptor signaling in synaptic plasticity and cognitive function. *Chang Gung Med J*, *33*(2), 115–125.

Huang, Y., & Liu, R. (2020). The toxicity and polymorphism of β -amyloid oligomers. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12), 4477.

Hubbard, S. R. (1999). Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *71*(3–4), 343–358.

Hume, D. A., Perry, V. H., & Gordon, S. (1983). Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *The Journal of Cell Biology*, *97*(1), 253–257.

I

Imbimbo, B. P., & Watling, M. (2019). Investigational BACE inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *28*(11), 967–975.

Inestrosa, N. C., Alvarez, A., Perez, C. A., Moreno, R. D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O. I., Soto, C., & Garrido, J. (1996). Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, *16*(4), 881–891.

Inestrosa, N. C., Sagal, J. P., & Colombres, M. (2005). Acetylcholinesterase interaction with Alzheimer amyloid β . *Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Aspects of Amyloid β* , 299–317.

Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (2010). Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies. In *Alzheimer's & Dementia* (Vol. 6, Issue 5, pp. 420–424). Elsevier.

Irvine, K., Laws, K. R., Gale, T. M., & Kondel, T. K. (2012). Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: a meta analysis. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, *34*(9), 989–998.

Ismail, R., Parbo, P., Madsen, L. S., Hansen, A. K., Hansen, K. V., Schaldemose, J. L., Kjeldsen, P. L., Stokholm, M. G., Gottrup, H., & Eskildsen, S. F. (2020). The relationships between neuroinflammation, beta-amyloid and tau deposition in Alzheimer's disease: a longitudinal PET study. *Journal of Neuroinflammation*, *17*, 1–11.

Ivanov, A., Esclapez, M., & Ferhat, L. (2009). Role of drebrin A in dendritic spine plasticity and synaptic function: implications in neurological disorders. *Communicative & Integrative Biology*, *2*(3), 268–270.

J

J Baranello, R., L Bharani, K., Padmaraju, V., Chopra, N., K Lahiri, D., H Greig, N., A Pappolla, M., & Sambamurti, K. (2015). Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, *12*(1), 32–46.

J Herrera, A., M Espinosa-Oliva, A., J Oliva-Martin, M., Carrillo-Jimenez, A., L Venero, J., & M de Pablos, R. (2015). Collateral damage: contribution of peripheral inflammation to neurodegenerative diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *15*(21), 2193–2210.

Jacobs, B., Driscoll, L., & Schall, M. (1997). Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: a quantitative Golgi study. *Journal of Comparative Neurology*, *386*(4), 661–680.

Jacobs, B., Schall, M., Prather, M., Kapler, E., Driscoll, L., Baca, S., Jacobs, J., Ford, K., Wainwright, M., & Trembl, M. (2001). Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative golgi study. *Cerebral Cortex*, *11*(6), 558–571.

Jagust, W. J., Seab, J. P., Huesman, R. H., Valk, P. E., Mathis, C. A., Reed, B. R., Coxson, P. G., & Budinger, T. F. (1991). Diminished glucose transport in Alzheimer's disease: dynamic PET studies. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *11*(2), 323–330.

James, B. D., Bennett, D. A., Boyle, P. A., Leurgans, S., & Schneider, J. A. (2012). Dementia from Alzheimer disease and mixed pathologies in the oldest old. *Jama*, *307*(17), 1798–1800.

Jankowska-Kulawy, A., Klimaszewska-Łata, J., Gul-Hinc, S., Ronowska, A., & Szutowicz, A. (2022). Metabolic and Cellular Compartments of Acetyl-CoA in the Healthy and Diseased Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(17), 10073.

- Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Lee, M. K., Younkin, L. H., & Wagner, S. L. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Human Molecular Genetics*, *13*(2), 159–170.
- Janson, J., Laedtke, T., Parisi, J. E., O'Brien, P., Petersen, R. C., & Butler, P. C. (2004). Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes*, *53*(2), 474–481.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., & Lansbury Jr, P. T. (1993). The C-Terminus of the β Protein is Critical in Amyloidogenesis a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *695*(1), 144–148.
- Jayaraj, R. L., Azimullah, S., Beiram, R., Jalal, F. Y., & Rosenberg, G. A. (2019). Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 1–24.
- Jiao, S. S., Shen, L. L., Zhu, C., Bu, X. L., Liu, Y. H., Liu, C. H., Yao, X. Q., Zhang, L. L., Zhou, H. D., & Walker, D. G. (2016). Brain-derived neurotrophic factor protects against tau-related neurodegeneration of Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry*, *6*(10), e907–e907.
- Jiao, S.-S., Bu, X.-L., Liu, Y.-H., Zhu, C., Wang, Q.-H., Shen, L.-L., Liu, C.-H., Wang, Y.-R., Yao, X.-Q., & Wang, Y.-J. (2016). Sex dimorphism profile of Alzheimer's disease-type pathologies in an APP/PS1 mouse model. *Neurotoxicity Research*, *29*, 256–266.
- Jin, X., Liu, M., Zhang, D., Zhong, X., Du, K., Qian, P., Yao, W., Gao, H., & Wei, M. (2019). Baicalin mitigates cognitive impairment and protects neurons from microglia-mediated neuroinflammation via suppressing NLRP 3 inflammasomes and TLR 4/NF- κ B signaling pathway. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *25*(5), 575–590.
- Jorm, A. F., & Jolley, D. (1998). The incidence of dementia: a meta-analysis. *Neurology*, *51*(3), 728–733.
- Juaristi, I., Contreras, L., González-Sánchez, P., Pérez-Liébana, I., González-Moreno, L., Pardo, B., Del Arco, A., & Satrústegui, J. (2019). The response to stimulation in neurons and astrocytes. *Neurochemical Research*, *44*, 2385–2391.

K

- Kalarchian, M. A., & Marcus, M. D. (2012). Psychiatric comorbidity of childhood obesity. *International Review of Psychiatry*, *24*(3), 241–246.

- Kalinin, S., Richardson, J. C., & Feinstein, D. L. (2009). A PPARdelta agonist reduces amyloid burden and brain inflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 6(5), 431–437.
- Kandimalla, R., Manczak, M., Yin, X., Wang, R., & Reddy, P. H. (2018). Hippocampal phosphorylated tau induced cognitive decline, dendritic spine loss and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 27(1), 30–40.
- Kang, D. E., & Woo, J. A. (2019). Cofilin, a master node regulating cytoskeletal pathogenesis in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 72(s1), S131–S144.
- Kapasi, A., DeCarli, C., & Schneider, J. A. (2017). Impact of multiple pathologies on the threshold for clinically overt dementia. *Acta Neuropathologica*, 134, 171–186.
- Karch, C. M., & Goate, A. M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological Psychiatry*, 77(1), 43–51.
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., & Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*, 33(3), 121–129.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*, 26(7), 360–368.
- Kastanenka, K. v, Bussiere, T., Shakerdige, N., Qian, F., Weinreb, P. H., Rhodes, K., & Bacskai, B. J. (2016). Immunotherapy with aducanumab restores calcium homeostasis in Tg2576 mice. *Journal of Neuroscience*, 36(50), 12549–12558.
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., & Lernmark, Å. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 1–17.
- Kaur, D., Sharma, V., & Deshmukh, R. (2019). Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, 27, 663–677.
- Kaytor, M. D., & Orr, H. T. (2002). The GSK3 β signaling cascade and neurodegenerative disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(3), 275–278.

- Kent, S. A., Spires-Jones, T. L., & Durrant, C. S. (2020). The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathologica*, 140(4), 417–447.
- Khachaturian, Z. S. (2022). The 'Aducanumab Story': Will the Last Chapter Spell the End of the 'Amyloid Hypothesis' or Mark a New Beginning? *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 9(2), 190–192.
- Kho, J., Ioannou, A., Mandal, A. K. J., & Missouris, C. G. (2021). Donepezil induces ventricular arrhythmias by delayed repolarisation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394, 559–560.
- Kiasalari, Z., Heydarifard, R., Khalili, M., Afshin-Majd, S., Baluchnejadmojarad, T., Zahedi, E., Sanaierad, A., & Roghani, M. (2017). Ellagic acid ameliorates learning and memory deficits in a rat model of Alzheimer's disease: an exploration of underlying mechanisms. *Psychopharmacology*, 234, 1841–1852.
- Kim, B. Y., Lee, S. H., Graham, P. L., Angelucci, F., Lucia, A., Pareja-Galeano, H., Leyhe, T., Turana, Y., Lee, I. R., & Yoon, J. H. (2017). Peripheral brain-derived neurotrophic factor levels in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Molecular Neurobiology*, 54, 7297–7311.
- Kim, H.-G. (2019). Cognitive dysfunctions in individuals with diabetes mellitus. *Yeungnam University Journal of Medicine*, 36(3), 183–191.
- Kim, J., Basak, J. M., & Holtzman, D. M. (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63(3), 287–303.
- Kim, S. K., Nabekura, J., & Koizumi, S. (2017). Astrocyte-mediated synapse remodeling in the pathological brain. *Glia*, 65(11), 1719–1727.
- Kim, S. U., & de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *Journal of Neuroscience Research*, 81(3), 302–313.
- Kim, T., Vidal, G. S., Djuricic, M., William, C. M., Birnbaum, M. E., Garcia, K. C., Hyman, B. T., & Shatz, C. J. (2013). Human LILRB2 is a β -amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model. *Science*, 341(6152), 1399–1404.
- Kimelberg, H. K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry International*, 45(2–3), 191–202.

- Klein, W. L., Krafft, G. A., & Finch, C. E. (2001). Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends in Neurosciences*, 24(4), 219–224.
- Kleinridders, A., Ferris, H. A., Cai, W., & Kahn, C. R. (2014). Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes*, 63(7), 2232–2243.
- Knezovic, A., Osmanovic-Barilar, J., Curlin, M., Hof, P. R., Simic, G., Riederer, P., & Salkovic-Petrisic, M. (2015). Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 122, 577–592.
- Knight, D., Xie, W., & Boulianne, G. L. (2011). Neurexins and neuroligins: recent insights from invertebrates. *Molecular Neurobiology*, 44, 426–440.
- Knopman, D. S. (2001). An overview of common non-Alzheimer dementias. *Clinics in Geriatric Medicine*, 17(2), 281–301.
- Knott, G., & Holtmaat, A. (2008). Dendritic spine plasticity—current understanding from in vivo studies. *Brain Research Reviews*, 58(2), 282–289.
- Koelsch, G. (2017). BACE1 function and inhibition: implications of intervention in the amyloid pathway of Alzheimer's disease pathology. *Molecules*, 22(10), 1723.
- Koepsell, H. (2020). Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 472(9), 1299–1343.
- Koffie, R. M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T., Adams, K. W., Mielke, M. L., Garcia-Alloza, M., Micheva, K. D., Smith, S. J., Kim, M. L., & Lee, V. M. (2009). Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 4012–4017.
- Kommaddi, R. P., Das, D., Karunakaran, S., Nanguneri, S., Bapat, D., Ray, A., Shaw, E., Bennett, D. A., Nair, D., & Ravindranath, V. (2018). A β mediates F-actin disassembly in dendritic spines leading to cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 38(5), 1085–1099.
- Kopp, W. (2019). How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 2221–2236.
- KoSIK, K. S., Joachim, C. L., & Selkoe, D. J. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(11), 4044–4048.

- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 312–318.
- Krishnan, N., Krishnan, K., Connors, C. R., Choy, M. S., Page, R., Peti, W., Van Aelst, L., Shea, S. D., & Tonks, N. K. (2015). PTP1B inhibition suggests a therapeutic strategy for Rett syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(8), 3163–3177.
- Kuang, G., He, Q., Zhang, Y., Zhuang, R., Xiang, A., Jiang, Q., Luo, Y., & Yang, J. (2012). Modulation of preactivation of PPAR- β on memory and learning dysfunction and inflammatory response in the hippocampus in rats exposed to global cerebral ischemia/reperfusion. *PPAR Research*, 2012.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Yano, W., Suzuki, R., Ueki, K., Takamoto, I., Satoh, H., Maki, T., & Kubota, T. (2004). Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in β cells and the hypothalamus. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(7), 917–927.
- Kuehn, B. M. (2008). Scientists probe immune system's role in brain function and neurological disease. *Jama*, 299(6), 619–620.
- Kuga, G. K., Muñoz, V. R., Gaspar, R. C., Nakandakari, S. C. B. R., da Silva, A. S. R., Botezelli, J. D., de Almeida Leme, J. A. C., Gomes, R. J., de Moura, L. P., & Cintra, D. E. (2018). Impaired insulin signaling and spatial learning in middle-aged rats: The role of PTP1B. *Experimental Gerontology*, 104, 66–71.
- Kuhl, D. E., Metter, E. J., Riege, W. H., & Phelps, M. E. (1982). Effects of human aging on patterns of local cerebral glucose utilization determined by the [18F] fluorodeoxyglucose method. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2(2), 163–171.
- Kullmann, D. M., & Lamsa, K. P. (2007). Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(9), 687–699.
- Kurochkin, I. V., Guarnera, E., & Berezovsky, I. N. (2018). Insulin-degrading enzyme in the fight against Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(1), 49–58.
- Kuusisto, J., Koivisto, K., Mykkänen, L., Helkala, E.-L., Vanhanen, M., Hänninen, T., Kervinen, K., Kesäniemi, Y. A., Riekkinen, P. J., & Laakso, M. (1997). Association between features of the insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease independently of apolipoprotein E4 phenotype: cross sectional population based study. *Bmj*, 315(7115), 1045–1049.

L

- Lacroix, M., Badonnel, K., Meunier, N., Tan, F., Poupon, C. S., Durieux, D., Monnerie, R., Baly, C., Congar, P., & Salesse, R. (2008). Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *Journal of Neuroendocrinology*, *20*(10), 1176–1190.
- Lai, T. W., Zhang, S., & Wang, Y. T. (2014). Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, *115*, 157–188.
- Lamichane, S., Dahal Lamichane, B., & Kwon, S.-M. (2018). Pivotal roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their signal cascade for cellular and whole-body energy homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4), 949.
- Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, *25*(1), 59–70.
- Langbaum, J. B. S., Chen, K., Lee, W., Reschke, C., Bandy, D., Fleisher, A. S., Alexander, G. E., Foster, N. L., Weiner, M. W., & Koeppe, R. A. (2009). Categorical and correlational analyses of baseline fluorodeoxyglucose positron emission tomography images from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). *Neuroimage*, *45*(4), 1107–1116.
- Lao, K., Zhang, R., Dai, Y., Luan, J., Guo, N., Xu, X., Zhang, Y., & Gou, X. (2021). Identification of novel A β -LilrB2 inhibitors as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *114*, 103630.
- Lavin, D. P., White, M. F., & Brazil, D. P. (2016). IRS proteins and diabetic complications. *Diabetologia*, *59*(11), 2280–2291.
- Laws, K. R., Irvine, K., & Gale, T. M. (2016). Sex differences in cognitive impairment in Alzheimer's disease. *World Journal of Psychiatry*, *6*(1), 54.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, *39*(1), 151–170.
- Lazzari, C., Kipanyula, M. J., Agostini, M., Pozzan, T., & Fasolato, C. (2015). A β 42 oligomers selectively disrupt neuronal calcium release. *Neurobiology of Aging*, *36*(2), 877–885.
- Lepeta, K., Lourenco, M. V., Schweitzer, B. C., Martino Adami, P. V., Banerjee, P., Catuara-Solarz, S., de La Fuente Revenga, M., Guillem, A. M., Haidar, M., & Ijomone, O. M. (2016). Synaptopathies: synaptic dysfunction in neurological

- disorders—A review from students to students. *Journal of Neurochemistry*, 138(6), 785–805.
- Lester-Coll, N., Rivera, E. J., Soscia, S. J., Doiron, K., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2006). Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 9(1), 13–33.
- Leszek, J., Trypka, E., V Tarasov, V., Md Ashraf, G., & Aliev, G. (2017). Type 3 diabetes mellitus: a novel implication of Alzheimers disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(12), 1331–1335.
- Levy-Lahad, E., Lahad, A., Wijsman, E. M., Bird, T. D., & Schellenberg, G. D. (1995). Apolipoprotein E genotypes and age of onset in early-onset familial Alzheimer's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 38(4), 678–680.
- Li, F., Liu, K., Wang, A., Harris, P. W. R., Vickers, M. H., & Guan, J. (2019). Cyclic glycine-proline administration normalizes high-fat diet-induced synaptophysin expression in obese rats. *Neuropeptides*, 76, 101935.
- Li, L., Lu, J., Tay, S. S. W., Moochhala, S. M., & He, B. P. (2007). The function of microglia, either neuroprotection or neurotoxicity, is determined by the equilibrium among factors released from activated microglia in vitro. *Brain Research*, 1159, 8–17.
- Li, X., Song, D., & Leng, S. X. (2015). Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment. *Clinical Interventions in Aging*, 549–560.
- Li, Y., Hui, C. L., Lee, E. H., Chang, W., Chan, S. K., Leung, C., & Chen, E. Y. (2014). Coupling physical exercise with dietary glucose supplement for treating cognitive impairment in schizophrenia: a theoretical model and future directions. *Early Intervention in Psychiatry*, 8(3), 209–220.
- Li, Z., Zhang, W., & Sima, A. A. F. (2005). The role of impaired insulin/IGF action in primary diabetic encephalopathy. *Brain Research*, 1037(1–2), 12–24.
- Lian, H., Yang, L., Cole, A., Sun, L., Chiang, A. C.-A., Fowler, S. W., Shim, D. J., Rodriguez-Rivera, J., Tagliabue, G., & Jankowsky, J. L. (2015). NFκB-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron*, 85(1), 101–115.
- Lin, K. A., Choudhury, K. R., Rathakrishnan, B. G., Marks, D. M., Petrella, J. R., Doraiswamy, P. M., & Initiative, A. D. N. (2015). Marked gender differences in

- progression of mild cognitive impairment over 8 years. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 1(2), 103–110.
- Lista, S., O'Bryant, S. E., Blennow, K., Dubois, B., Hugon, J., Zetterberg, H., & Hampel, H. (2015). Biomarkers in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 47(2), 291–317.
- Liu, B. I. N., & Hong, J.-S. (2003). Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(1), 1–7.
- Liu, B., Ou, G., Chen, Y., & Zhang, J. (2019). Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B protects against sevoflurane-induced neurotoxicity mediated by ER stress in developing brain. *Brain Research Bulletin*, 146, 28–39.
- Liu, F., Zaidi, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Merkle, R. K., & Gong, C.-X. (2002). Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Letters*, 512(1–3), 101–106.
- Liu, P.-P., Xie, Y., Meng, X.-Y., & Kang, J.-S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1), 29.
- Liu, W., Wong, A., Law, A. C. K., & Mok, V. C. T. (2015). Cerebrovascular disease, amyloid plaques, and dementia. *Stroke*, 46(5), 1402–1407.
- Liu, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Gong, C. (2011). Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *The Journal of Pathology*, 225(1), 54–62.
- Liu, Y., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., & Gong, C.-X. (2008). Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Letters*, 582(2), 359–364.
- Lloret, A., Fuchsberger, T., Giraldo, E., & Vina, J. (2015). Molecular mechanisms linking amyloid β toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 83, 186–191.
- Loh, K., Zhang, L., Brandon, A., Wang, Q., Begg, D., Qi, Y., Fu, M., Kulkarni, R., Teo, J., & Baldock, P. (2017). Insulin controls food intake and energy balance via NPY neurons. *Molecular Metabolism*, 6(6), 574–584.
- Love, S., & Miners, J. S. (2016). Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 131, 645–658.

Lublin, A. L., & Gandy, S. (2010). Amyloid- β Oligomers: Possible Roles as Key Neurotoxins in Alzheimer's Disease. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77(1), 43–49.

Lucas, S., Rothwell, N. J., & Gibson, R. M. (2006). The role of inflammation in CNS injury and disease. *British Journal of Pharmacology*, 147(S1), S232–S240.

Lucier, J., & Weinstock, R. S. (2018). *Diabetes mellitus type 1*.

Lyman, M., Lloyd, D. G., Ji, X., Vizcaychipi, M. P., & Ma, D. (2014). Neuroinflammation: the role and consequences. *Neuroscience Research*, 79, 1–12.

M

M de la Monte, S. (2012). Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 9(1), 35–66.

Ma, L., Wang, J., & Li, Y. (2015). Insulin resistance and cognitive dysfunction. *Clinica Chimica Acta*, 444, 18–23.

Maccioni, R. B., Farías, G., Morales, I., & Navarrete, L. (2010). The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Archives of Medical Research*, 41(3), 226–231.

Maccioni, R. B., Muñoz, J. P., & Barbeito, L. (2001). The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Archives of Medical Research*, 32(5), 367–381.

Maccioni, R. B., Rojo, L. E., Fernandez, J. A., & Kuljis, R. O. (2009). The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153(1), 240–246.

Machová, E., Rudajev, V., Smyčková, H., Koivisto, H., Tanila, H., & Doležal, V. (2010). Functional cholinergic damage develops with amyloid accumulation in young adult APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 38(1), 27–35.

Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (1999). Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 354(1387), 1155–1163.

Mahase, E. (2021). *Three FDA advisory panel members resign over approval of Alzheimer's drug*. British Medical Journal Publishing Group.

- Mahley, R. W. (2016). Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *Journal of Molecular Medicine*, *94*, 739–746.
- Majewska, A. K., Newton, J. R., & Sur, M. (2006). Remodeling of synaptic structure in sensory cortical areas in vivo. *Journal of Neuroscience*, *26*(11), 3021–3029.
- Malm, T., Mariani, M., Donovan, L. J., Neilson, L., & Landreth, G. E. (2015). Activation of the nuclear receptor PPAR δ is neuroprotective in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease through inhibition of inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, *12*(1), 1–15.
- Malpetti, M., Kievit, R. A., Passamonti, L., Jones, P. S., Tsvetanov, K. A., Rittman, T., Mak, E., Nicastro, N., Bevan-Jones, W. R., & Su, L. (2020). Microglial activation and tau burden predict cognitive decline in Alzheimer's disease. *Brain*, *143*(5), 1588–1602.
- Man, S., Ubogu, E. E., & Ransohoff, R. M. (2007). Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain Pathology*, *17*(2), 243–250.
- Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (1998). Tau in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology*, *8*(11), 425–427.
- Maphis, N., Xu, G., Kokiko-Cochran, O. N., Jiang, S., Cardona, A., Ransohoff, R. M., Lamb, B. T., & Bhaskar, K. (2015). Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain*, *138*(6), 1738–1755.
- Marcus, C., Mena, E., & Subramaniam, R. M. (2014). Brain PET in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Clinical Nuclear Medicine*, *39*(10), e413.
- Marriott, R. J., Murray, K., Flicker, L., Hankey, G. J., Matsumoto, A. M., Dwivedi, G., Antonio, L., Almeida, O. P., Bhasin, S., & Dobs, A. S. (2022). Lower serum testosterone concentrations are associated with a higher incidence of dementia in men: The UK Biobank prospective cohort study. *Alzheimer's & Dementia*, *18*(10), 1907–1918.
- Martín, E. D., Sanchez-Perez, A., Trejo, J. L., Martín-Aldana, J. A., Cano Jaimez, M., Pons, S., Acosta Umanzor, C., Menes, L., White, M. F., & Burks, D. J. (2012). IRS-2 deficiency impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Cerebral Cortex*, *22*(8), 1717–1727.
- Martin, L., Latypova, X., & Terro, F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, *58*(4), 458–471.

- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M.-L., Yardin, C., & Terro, F. (2013). Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews, 12*(1), 289–309.
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Reports, 6*.
- Masliah, E., Mallory, M., Hansen, L., DeTeresa, R., & Terry, R. D. (1993). Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging. *Neurology, 43*(1 Part 1), 192.
- Masliah, E., Terry, R. D., Mallory, M., Alford, M., & Hansen, L. (1990). Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology, 137*(6), 1293.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature, 429*(6993), 761–766.
- Matsuzaki, T., Sasaki, K., Tanizaki, Y., Hata, J., Fujimi, K., Matsui, Y., Sekita, A., Suzuki, S. O., Kanba, S., & Kiyohara, Y. (2010). Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the Hisayama study. *Neurology, 75*(9), 764–770.
- Mayer, C. M., & Belsham, D. D. (2010). Central insulin signaling is attenuated by long-term insulin exposure via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation, proteasomal degradation, and lysosomal insulin receptor degradation. *Endocrinology, 151*(1), 75–84.
- Mayeux, R. (2003). Epidemiology of neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience, 26*(1), 81–104.
- Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2*(8), a006239.
- Mazon, J. N., de Mello, A. H., Ferreira, G. K., & Rezin, G. T. (2017). The impact of obesity on neurodegenerative diseases. *Life Sciences, 182*, 22–28.
- McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *Journal of Alzheimer's Disease, 19*(1), 355–361.
- McGrattan, A. M., McGuinness, B., McKinley, M. C., Kee, F., Passmore, P., Woodside, J. V., & McEvoy, C. T. (2019). Diet and inflammation in cognitive ageing and Alzheimer's disease. *Current Nutrition Reports, 8*, 53–65.

- McRORY, J. E., & SHERWOOD, N. M. (1997). Ancient divergence of insulin and insulin-like growth factor. *DNA and Cell Biology*, 16(8), 939–949.
- Meakin, P. J., Coull, B. M., Tuharska, Z., McCaffery, C., Akoumianakis, I., Antoniadis, C., Brown, J., Griffin, K. J., Platt, F., & Ozber, C. H. (2020). Elevated circulating amyloid concentrations in obesity and diabetes promote vascular dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(8), 4104–4117.
- Meakin, P. J., Harper, A. J., Hamilton, D. L., Gallagher, J., McNeilly, A. D., Burgess, L. A., Vaanholt, L. M., Bannon, K. A., Latcham, J., & Hussain, I. (2012). Reduction in BACE1 decreases body weight, protects against diet-induced obesity and enhances insulin sensitivity in mice. *Biochemical Journal*, 441(1), 285–296.
- Medeiros, R., Baglietto-Vargas, D., & LaFerla, F. M. (2011). The role of tau in Alzheimer’s disease and related disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 17(5), 514–524.
- Medeiros, R., & LaFerla, F. M. (2013). Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Experimental Neurology*, 239, 133–138.
- Mehla, J., Chauhan, B. C., & Chauhan, N. B. (2014). Experimental induction of type 2 diabetes in aging-accelerated mice triggered Alzheimer-like pathology and memory deficits. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 39(1), 145–162.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in Neurosciences*, 36(10), 587–597.
- Merlo, S., Spampinato, S. F., Caruso, G. I., & Sortino, M. A. (2020). The ambiguous role of microglia in A β toxicity: chances for therapeutic intervention. *Current Neuropharmacology*, 18(5), 446–455.
- Metcalfe, M. J., & Figueiredo-Pereira, M. E. (2010). Relationship between tau pathology and neuroinflammation in Alzheimer’s disease. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77(1), 50–58.
- Meyer-Luehmann, M., Mielke, M., Spires-Jones, T. L., Stoothoff, W., Jones, P., Bacskai, B. J., & Hyman, B. T. (2009). A reporter of local dendritic translocation shows plaque-related loss of neural system function in APP-transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 29(40), 12636–12640.
- Mezeiova, E., Soukup, O., & Korabecny, J. (2020). Huprines—an insight into the synthesis and biological properties. *Russian Chemical Reviews*, 89(10), 999.

- Michelucci, A., Heurtaux, T., Grandbarbe, L., Morga, E., & Heuschling, P. (2009). Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: effects of oligomeric and fibrillar amyloid- β . *Journal of Neuroimmunology*, 210(1–2), 3–12.
- Mielke, M. M., Vemuri, P., & Rocca, W. A. (2014). Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clinical Epidemiology*, 37–48.
- Minoshima, S., Giordani, B., Berent, S., Frey, K. A., Foster, N. L., & Kuhl, D. E. (1997). Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 42(1), 85–94.
- Minter, M. R., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2016). The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 136(3), 457–474.
- Miranda, M., Morici, J. F., Zanoni, M. B., & Bekinschtein, P. (2019). Brain-derived neurotrophic factor: a key molecule for memory in the healthy and the pathological brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 363.
- Mitchell, C. S., & Begg, D. P. (2021). The regulation of food intake by insulin in the central nervous system. *Journal of Neuroendocrinology*, 33(4), e12952.
- Moloney, A. M., Griffin, R. J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., & O'Neill, C. (2010). Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiology of Aging*, 31(2), 224–243.
- Montaigne, D., Butruille, L., & Staels, B. (2021). PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. *Nature Reviews Cardiology*, 18(12), 809–823.
- Morales, I., Farías, G., & Maccioni, R. B. (2010). La neuroinflamación como factor detonante del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 48(1), 49–57.
- Morales, I., Jiménez, J. M., Mancilla, M., & Maccioni, R. B. (2013). Tau oligomers and fibrils induce activation of microglial cells. *Journal of Alzheimer's Disease*, 37(4), 849–856.
- Morphy, R., & Rankovic, Z. (2005). Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(21), 6523–6543.

- Mortimer, J. A., Snowden, D. A., & Markesbery, W. R. (2003). Head circumference, education and risk of dementia: findings from the Nun Study. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 25(5), 671–679.
- Mott, R. T., & Hulette, C. M. (2005). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clinics*, 15(4), 755–765.
- Mrass, P., & Weninger, W. (2006). Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors. *Immunological Reviews*, 213(1), 195–212.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.-Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., & McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of A β 1–42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *Journal of Neuroscience*, 20(11), 4050–4058.
- Mufson, E. J., Ikonomic, M. D., Counts, S. E., Perez, S. E., Malek-Ahmadi, M., Scheff, S. W., & Ginsberg, S. D. (2016). Molecular and cellular pathophysiology of preclinical Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 311, 54–69.
- Mulder, S. D., Veerhuis, R., Blankenstein, M. A., & Nielsen, H. M. (2012). The effect of amyloid associated proteins on the expression of genes involved in amyloid- β clearance by adult human astrocytes. *Experimental Neurology*, 233(1), 373–379.
- Müller, U. C., Deller, T., & Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(5), 281–298.
- Multhaup, G., Huber, O., Buée, L., & Galas, M.-C. (2015). Amyloid precursor protein (APP) metabolites APP intracellular fragment (AICD), A β 42, and tau in nuclear roles. *Journal of Biological Chemistry*, 290(39), 23515–23522.
- Muñoz, S. S., Garner, B., & Ooi, L. (2019). Understanding the role of ApoE fragments in Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 44(6), 1297–1305.
- Muñoz-Torrero, D., & Camps, P. (2008). Huprines for Alzheimer's disease drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3(1), 65–81.
- Musial, A., Bajda, M., & Malawska, B. (2007). Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 14(25), 2654–2679.

Musso, G., Gambino, R., De Michieli, F., Cassader, M., Rizzetto, M., Durazzo, M., Fagà, E., Silli, B., & Pagano, G. (2003). Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, *37*(4), 909–916.

N

Nadra, K., Anghel, S. I., Joye, E., Tan, N. S., Basu-Modak, S., Trono, D., Wahli, W., & Desvergne, B. (2006). Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor β/δ . *Molecular and Cellular Biology*, *26*(8), 3266–3281.

Nagele, R. G., D'Andrea, M. R., Lee, H., Venkataraman, V., & Wang, H.-Y. (2003). Astrocytes accumulate A β 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Research*, *971*(2), 197–209.

Naito, Y., Tanabe, Y., Lee, A. K., Hamel, E., & Takahashi, H. (2017). Amyloid- β oligomers interact with neurexin and diminish neurexin-mediated excitatory presynaptic organization. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13.

Najem, D., Bamji-Mirza, M., Chang, N., Liu, Q. Y., & Zhang, W. (2014). Insulin resistance, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*, *25*(4), 509–525.

Nakandakari, S. C. B. R., Munoz, V. R., Kuga, G. K., Gaspar, R. C., Sant'Ana, M. R., Pavan, I. C. B., da Silva, L. G. S., Morelli, A. P., Simabuco, F. M., & da Silva, A. S. R. (2019). Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *79*, 284–293.

Neddenriep, B., Calciano, A., Conti, D., Sauve, E., Paterson, M., Bruno, E., & Moffet, D. A. (2011). Short peptides as inhibitors of amyloid aggregation. *The Open Biotechnology Journal*, *5*, 39.

Neth, B. J., & Craft, S. (2017). Insulin resistance and Alzheimer's disease: bioenergetic linkages. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*, 345.

Neuner, S. M., Telpoukhovskaia, M., Menon, V., O'Connell, K. M. S., Hohman, T. J., & Kaczorowski, C. C. (2022). Translational approaches to understanding resilience to Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*.

Newman, L. A., Korol, D. L., & Gold, P. E. (2011). Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PLoS One*, *6*(12), e28427.

- Nguyen, K., Hoffman, H., Chakkampambil, B., & Grossberg, G. T. (2021). Evaluation of rivastigmine in Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Disease Management*, *11*(1), 35–48.
- Nguyen, K. V. (2018). Alzheimer's disease. *AIMS Neuroscience*, *5*(1), 74.
- Nicolas, M., & Hassan, B. A. (2014). Amyloid precursor protein and neural development. *Development*, *141*(13), 2543–2548.
- Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D. D. M., & Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*, *457*(7232), 981–989.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, *308*(5726), 1314–1318.
- Nisbet, R. M., Polanco, J.-C., Ittner, L. M., & Götz, J. (2015). Tau aggregation and its interplay with amyloid- β . *Acta Neuropathologica*, *129*, 207–220.
- Nitsch, R. M., Slack, B. E., Wurtman, R. J., & Growdon, J. H. (1992). Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science*, *258*(5080), 304–307.
- Noble, W., Hanger, D. P., Miller, C. C. J., & Lovestone, S. (2013). The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neurology*, *4*, 83.
- Noguchi, J., Nagaoka, A., Watanabe, S., Ellis-Davies, G. C. R., Kitamura, K., Kano, M., Matsuzaki, M., & Kasai, H. (2011). In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure–function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *The Journal of Physiology*, *589*(10), 2447–2457.
- Nordberg, A., & Svensson, A.-L. (1998). Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology. *Drug Safety*, *19*, 465–480.

O

- Obici, S., Zhang, B. B., Karknias, G., & Rossetti, L. (2002). Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nature Medicine*, *8*(12), 1376–1382.
- Ochiai, T., Sano, T., Nagayama, T., Kubota, N., Kadowaki, T., Wakabayashi, T., & Iwatsubo, T. (2021). Differential involvement of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in brain insulin signaling is associated with the effects on amyloid

- pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 159, 105510.
- Ohara, T., Doi, Y., Ninomiya, T., Hirakawa, Y., Hata, J., Iwaki, T., Kanba, S., & Kiyohara, Y. (2011). Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study. *Neurology*, 77(12), 1126–1134.
- Okabe, S. (2007). Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 34(4), 503–518.
- Oliveira, J. M., Rebuffat, S. A., Gasa, R., & Gomis, R. (2014). Targeting type 2 diabetes: lessons from a knockout model of insulin receptor substrate 2. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 92(8), 613–620.
- Olloquequi, J., Cano, A., Sanchez-López, E., Carrasco, M., Verdaguer, E., Fortuna, A., Folch, J., Bulló, M., Auladell, C., & Camins, A. (2022). Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) as a potential therapeutic target for neurological disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 155, 113709.
- O'Neill, C., Anderton, B., Anderton, B. H., Betts, J., Blackstock, W. P., Brion, J.-P., Chapman, S., Connell, J., Dayanandan, R., & Gallo, J.-M. (2001). Sites of phosphorylation in tau and factors affecting their regulation. *Biochemical Society Symposia*, 67, 73–80.
- Orkand, R. K., Nicholls, J. G., & Kuffler, S. W. (1966). Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *Journal of Neurophysiology*, 29(4), 788–806.
- Ott, A., Stolk, R. P., Hofman, A., van Harskamp, F., Grobbee, D. E., & Breteler, M. M. B. (1996). Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia*, 39, 1392–1397.
- Ott, A., Stolk, R. P., van Harskamp, F., Pols, H. A. P., Hofman, A., & Breteler, M. M. B. (1999). Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*, 53(9), 1937.
- Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Santos, A. N., Grune, T., & Simm, A. (2014). Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*, 2, 411–429.
- Ozek, C., Kanoski, S. E., Zhang, Z.-Y., Grill, H. J., & Bence, K. K. (2014). Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is a novel regulator of central brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin receptor kinase B (TrkB) signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 289(46), 31682–31692.

P

- Palomer, X., Barroso, E., Pizarro-Delgado, J., Peña, L., Botteri, G., Zarei, M., Aguilar, D., Montori-Grau, M., & Vázquez-Carrera, M. (2018). PPAR β/δ : a key therapeutic target in metabolic disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), 913.
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(6), 383–400.
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M.-E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., & Bennett, M. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, *110*(21), 3458–3483.
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., Hempstead, B. L., Littman, D. R., & Gan, W.-B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, *155*(7), 1596–1609.
- Parsons, C. G., Albrecht, M., & Rammes, G. (2009). P1-017: Memantine reverses β -amyloid oligomers-induced deficits in long term potentiation (LTP) in murine hippocampal slices. *Alzheimer's & Dementia*, *5*(4S_Part_6), P176–P176.
- Parsons, C. G., Danysz, W., Dekundy, A., & Pulte, I. (2013). Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotoxicity Research*, *24*, 358–369.
- Parsons, C. G., Danysz, W., & Quack, G. (1999). Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist—a review of preclinical data. *Neuropharmacology*, *38*(6), 735–767.
- Parsons, C. G., Gruner, R., Rozental, J., Millar, J., & Lodge, D. (1993). Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3, 5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology*, *32*(12), 1337–1350.
- Parsons, C. G., Stöffler, A., & Danysz, W. (2007). Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system—too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology*, *53*(6), 699–723.
- Pasquier, F., Boulogne, A., Leys, D., & Fontaine, P. (2006). Diabetes mellitus and dementia. *Diabetes & Metabolism*, *32*(5), 403–414.

- Pekny, M., & Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological Reviews*, *94*(4), 1077–1098.
- Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhäuser, C., Lee, J.-M., Parpura, V., Hol, E. M., Sofroniew, M. V., & Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathologica*, *131*, 323–345.
- Pelucchi, S., Gardoni, F., Di Luca, M., & Marcello, E. (2022). Synaptic dysfunction in early phases of Alzheimer’s Disease. *Handbook of Clinical Neurology*, *184*, 417–438.
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, *32*(8), 421–431.
- Pérez-Areales, F. J., Betari, N., Viayna, A., Pont, C., Espargaró, A., Bartolini, M., De Simone, A., Rinaldi Alvarenga, J. F., Pérez, B., & Sabate, R. (2017). Design, synthesis and multitarget biological profiling of second-generation anti-Alzheimer rhein–huprine hybrids. *Future Medicinal Chemistry*, *9*(10), 965–981.
- Perry, E., Tomlinson, B., Blessed, G., Perry, R., Cross, A., & Crow, T. (1981). Noradrenergic and cholinergic systems in senile dementia of Alzheimer type. *The Lancet*, *318*(8238), 149.
- Peters, J. M., Lee, S. S. T., Li, W., Ward, J. M., Gavrilova, O., Everett, C., Reitman, M. L., Hudson, L. D., & Gonzalez, F. J. (2000). Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor β (δ). *Molecular and Cellular Biology*, *20*(14), 5119–5128.
- Peters, O., Schipke, C. G., Hashimoto, Y., & Kettenmann, H. (2003). Different mechanisms promote astrocyte Ca²⁺ waves and spreading depression in the mouse neocortex. *Journal of Neuroscience*, *23*(30), 9888–9896.
- Pfeiffer, T., Poll, S., Bancelin, S., Angibaud, J., Inavalli, V. V. G. K., Keppler, K., Mittag, M., Fuhrmann, M., & Nägerl, U. V. (2018). Chronic 2P-STED imaging reveals high turnover of dendritic spines in the hippocampus in vivo. *Elife*, *7*, e34700.
- Phiel, C. J., Wilson, C. A., Lee, V. M.-Y., & Klein, P. S. (2003). GSK-3 α regulates production of Alzheimer’s disease amyloid- β peptides. *Nature*, *423*(6938), 435–439.
- Piaceri, I., Nacmias, B., & Sorbi, S. (2013). Genetics of familial and sporadic Alzheimer’s disease. *Frontiers in Bioscience-Elite*, *5*(1), 167–177.

- Piert, M., Koeppe, R. A., Giordani, B., Berent, S., & Kuhl, D. E. (1996). Diminished glucose transport and phosphorylation in Alzheimer's disease determined by dynamic FDG-PET. *Journal of Nuclear Medicine*, *37*(2), 201–208.
- Pike, C. J. (2017). Sex and the development of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(1–2), 671–680.
- Pillay, O. C., & Manyonda, I. (2022). The surgical menopause. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*.
- Pinel, P. (1806). *A treatise on insanity*.
- Pines, A. (2016). Alzheimer's disease, menopause and the impact of the estrogenic environment. *Climacteric*, *19*(5), 430–432.
- Pivovarov, O., Höhn, A., Grune, T., Pfeiffer, A. F. H., & Rudovich, N. (2016). Insulin-degrading enzyme: new therapeutic target for diabetes and Alzheimer's disease? *Annals of Medicine*, *48*(8), 614–624.
- Plucińska, K., Dekeryte, R., Koss, D., Shearer, K., Mody, N., Whitfield, P. D., Doherty, M. K., Mingarelli, M., Welch, A., & Riedel, G. (2016). Neuronal human BACE1 knockin induces systemic diabetes in mice. *Diabetologia*, *59*, 1513–1523.
- Plum, L., Schubert, M., & Brüning, J. C. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *16*(2), 59–65.
- Pocai, A., Morgan, K., Buettner, C., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., & Rossetti, L. (2005). Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance. *Diabetes*, *54*(11), 3182–3189.
- Poduslo, J. F., Curran, G. L., & Berg, C. T. (1994). Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(12), 5705–5709.
- Pomytkin, I., Costa-Nunes, J. P., Kasatkin, V., Veniaminova, E., Demchenko, A., Lyundup, A., Lesch, K., Ponomarev, E. D., & Strekalova, T. (2018). Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *24*(9), 763–774.
- Popescu, B. O., Toescu, E. C., Popescu, L. M., Bajenaru, O., Muresanu, D. F., Schultzberg, M., & Bogdanovic, N. (2009). Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia. *Journal of the Neurological Sciences*, *283*(1–2), 99–106.
- Postina, R. (2008). A closer look at α -secretase. *Current Alzheimer Research*, *5*(2), 179–186.

Pugazhenthhi, S., Qin, L., & Reddy, P. H. (2017). Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(5), 1037–1045.

Puzzo, D., Gulisano, W., Palmeri, A., & Arancio, O. (2015). Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(7), 703–711.

Q

Qi, Z., Xu, Y., Liang, Z., Li, S., Wang, J., Wei, Y., & Dong, B. (2015). Baicalein alters PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathway in rats with diabetes-associated cognitive deficits. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(2), 1993.

Qiu, C., Kivipelto, M., & von Strauss, E. (2022). Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience*.

Qiu, C., Kivipelto, M., & Von Strauss, E. (2022). Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience*.

Qiu, T., Liu, Q., Chen, Y., Zhao, Y., & Li, Y. (2015). A β 42 and A β 40: similarities and differences. *Journal of Peptide Science*, 21(7), 522–529.

Qiu, W. Q., & Folstein, M. F. (2006). Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid- β peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiology of Aging*, 27(2), 190–198.

Qiu, W. Q., Walsh, D. M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M. B., Rosner, M. R., Safavi, A., Hersh, L. B., & Selkoe, D. J. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid β -protein by degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32730–32738.

R

Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19(8), 987–991.

Rebeck, G. W., Kindy, M., & LaDu, M. J. (2002). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the protective effects of ApoE2 and E3. *Journal of Alzheimer's Disease*, 4(3), 145–154.

Reich, D., Gallucci, G., Tong, M., & De La Monte, S. M. (2018). Therapeutic Advantages of Dual Targeting of PPAR- δ and PPAR- γ in an Experimental Model of Sporadic

- Alzheimer's Disease. *Journal of Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease*, 5(1).
- Reilly, A. M., Tsai, A. P., Lin, P. B., Ericsson, A. C., Oblak, A. L., & Ren, H. (2020). Metabolic defects caused by high-fat diet modify disease risk through inflammatory and amyloidogenic pathways in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutrients*, 12(10), 2977.
- Reinhard, C., Hébert, S. S., & de Strooper, B. (2005). The amyloid- β precursor protein: integrating structure with biological function. *The EMBO Journal*, 24(23), 3996–4006.
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., & Möbius, H. J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1333–1341.
- Ricke, K. M., Cruz, S. A., Qin, Z., Farrokhi, K., Sharmin, F., Zhang, L., Zasloff, M. A., Stewart, A. F. R., & Chen, H.-H. (2020). Neuronal protein tyrosine phosphatase 1B hastens amyloid β -associated Alzheimer's disease in mice. *Journal of Neuroscience*, 40(7), 1581–1593.
- Riley, K. P., Snowdon, D. A., Desrosiers, M. F., & Markesbery, W. R. (2005). Early life linguistic ability, late life cognitive function, and neuropathology: findings from the Nun Study. *Neurobiology of Aging*, 26(3), 341–347.
- Rivera, E. J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2005). Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *Journal of Alzheimer's Disease*, 8(3), 247–268.
- Rivest, S. (2009). Regulation of innate immune responses in the brain. *Nature Reviews Immunology*, 9(6), 429–439.
- Roberts, R. O., Knopman, D. S., Cha, R. H., Mielke, M. M., Pankratz, V. S., Boeve, B. F., Kantarci, K., Geda, Y. E., Jack, C. R., & Petersen, R. C. (2014). Diabetes and elevated hemoglobin A1c levels are associated with brain hypometabolism but not amyloid accumulation. *Journal of Nuclear Medicine*, 55(5), 759–764.
- Rocca, W. A., Grossardt, B. R., & Shuster, L. T. (2011). Oophorectomy, menopause, estrogen treatment, and cognitive aging: clinical evidence for a window of opportunity. *Brain Research*, 1379, 188–198.
- Rochefort, N. L., & Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Reports*, 13(8), 699–708.

- Rockl, K. S. C., Hirshman, M. F., Brandauer, J., Fujii, N., Witters, L. A., & Goodyear, L. J. (2007). Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes*, *56*(8), 2062–2069.
- Rodríguez, J. J., & Verkhratsky, A. (2011). Neuroglial roots of neurodegenerative diseases? *Molecular Neurobiology*, *43*, 87–96.
- Rodríguez-Calvo, R., Serrano, L., Coll, T., Moullan, N., Sánchez, R. M., Merlos, M., Palomer, X., Laguna, J. C., Michalik, L., & Wahli, W. (2008). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor- κ B activity via extracellular signal-related kinase 1/2. *Diabetes*, *57*(8), 2149–2157.
- Rodríguez-Gómez, J. A., Kavanagh, E., Engskog-Vlachos, P., Engskog, M. K. R., Herrera, A. J., Espinosa-Oliva, A. M., Joseph, B., Hajji, N., Venero, J. L., & Burguillos, M. A. (2020). Microglia: agents of the CNS pro-inflammatory response. *Cells*, *9*(7), 1717.
- Rogawski, M. A., & Wenk, G. L. (2003). The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Reviews*, *9*(3), 275–308.
- Rolls, A., Shechter, R., & Schwartz, M. (2009). The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(3), 235–241.
- Rosario, E. R., Chang, L., Head, E. H., Stanczyk, F. Z., & Pike, C. J. (2011). Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *32*(4), 604–613.
- Rossi, D., & Volterra, A. (2009). Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Research Bulletin*, *80*(4–5), 224–232.
- Rozkalne, A., Spires-Jones, T. L., Stern, E. A., & Hyman, B. T. (2009). A single dose of passive immunotherapy has extended benefits on synapses and neurites in an Alzheimer's disease mouse model. *Brain Research*, *1280*, 178–185.
- Ruitenbergh, A., Ott, A., van Swieten, J. C., Hofman, A., & Breteler, M. M. B. (2001). Incidence of dementia: does gender make a difference? *Neurobiology of Aging*, *22*(4), 575–580.
- Rush, T., Martinez-Hernandez, J., Dollmeyer, M., Frandemiche, M. L., Borel, E., Boisseau, S., Jacquier-Sarlin, M., & Buisson, A. (2018). Synaptotoxicity in Alzheimer's disease involved a dysregulation of actin cytoskeleton dynamics through cofilin 1 phosphorylation. *Journal of Neuroscience*, *38*(48), 10349–10361.

- Russell-Jones, D., & Khan, R. (2007). Insulin-associated weight gain in diabetes—causes, effects and coping strategies. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 9(6), 799–812.
- Rust, M. B. (2015). ADF/cofilin: a crucial regulator of synapse physiology and behavior. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 3521–3529.
- Rust, M. B., Gurniak, C. B., Renner, M., Vara, H., Morando, L., Görlich, A., Sassoè-Pognetto, M., Bancaabouchi, M. Al, Giustetto, M., & Triller, A. (2010). Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *The EMBO Journal*, 29(11), 1889–1902.
- Ruud, J., Steculorum, S. M., & Brüning, J. C. (2017). Neuronal control of peripheral insulin sensitivity and glucose metabolism. *Nature Communications*, 8(1), 15259.
- Ryu, J. C., Zimmer, E. R., Rosa-Neto, P., & Yoon, S. O. (2019). Consequences of metabolic disruption in Alzheimer’s disease pathology. *Neurotherapeutics*, 16, 600–610.

S

- Sáez-Orellana, F., Octave, J.-N., & Pierrot, N. (2020). Alzheimer’s disease, a lipid story: involvement of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Cells*, 9(5), 1215.
- Saito, T., & Saido, T. C. (2018). Neuroinflammation in mouse models of Alzheimer’s disease. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 9(4), 211–218.
- Sakono, M., & Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *The FEBS Journal*, 277(6), 1348–1358.
- Sala, C., & Segal, M. (2014). Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiological Reviews*, 94(1), 141–188.
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799–806.
- Salvadó, L., Serrano-Marco, L., Barroso, E., Palomer, X., & Vázquez-Carrera, M. (2012). Targeting PPAR β/δ for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(2), 209–223.
- Samanta, S., Ramesh, M., & Govindaraju, T. (2022). *Alzheimer’s is a Multifactorial Disease*.

- Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverría, I., & Monge-Bonilla, C. (2017). Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: an update. *Annals of Neurosciences*, 24(1), 46–54.
- Sánchez-Sarasúa, S., Fernández-Pérez, I., Espinosa-Fernández, V., Sánchez-Pérez, A. M., & Ledesma, J. C. (2020). Can we treat neuroinflammation in Alzheimer's disease? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8751.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M. M., Teplow, D. B., & Haass, C. (2001). Presenilin-dependent γ -secretase processing of β -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Reports*, 2(9), 835–841.
- Sathya, M., Premkumar, P., Karthick, C., Moorthi, P., Jayachandran, K. S., & Anusuyadevi, M. (2012). BACE1 in Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta*, 414, 171–178.
- Sato, T., Shimogaito, N., Wu, X., Kikuchi, S., Yamagishi, S., & Takeuchi, M. (2006). Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*®, 21(3), 197–208.
- Scarmeas, N., Stern, Y., Mayeux, R., Manly, J. J., Schupf, N., & Luchsinger, J. A. (2009). Mediterranean diet and mild cognitive impairment. *Archives of Neurology*, 66(2), 216–225.
- Schachter, A. S., & Davis, K. L. (2022). Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*.
- Schaeffer, E. L., & Gattaz, W. F. (2008). Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A 2 enzyme. *Psychopharmacology*, 198, 1–27.
- Schenk, D., Basi, G. S., & Pangalos, M. N. (2012). Treatment strategies targeting amyloid β -protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(9), a006387.
- Schliebs, R., & Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 555–563.
- Schmitt, B., Bernhardt, T., Moeller, H.-J., Heuser, I., & Frölich, L. (2004). Combination therapy in Alzheimer's disease: a review of current evidence. *CNS Drugs*, 18, 827–844.
- Schnedl, W. J., Ferber, S., Johnson, J. H., & Newgard, C. B. (1994). STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*, 43(11), 1326–1333.

- Schubert, M., Brazil, D. P., Burks, D. J., Kushner, J. A., Ye, J., Flint, C. L., Farhang-Fallah, J., Dikkes, P., Warot, X. M., & Rio, C. (2003). Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *Journal of Neuroscience*, *23*(18), 7084–7092.
- Schuler, M., Ali, F., Chambon, C., Duteil, D., Bornert, J.-M., Tardivel, A., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., & Metzger, D. (2006). PGC1 α expression is controlled in skeletal muscles by PPAR β , whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metabolism*, *4*(5), 407–414.
- Schulinkamp, R. J., Pagano, T. C., Hung, D., & Raffa, R. B. (2000). Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *24*(8), 855–872.
- Schwartz, M. W., Bergman, R. N., Kahn, S. E., Taborsky, G. J., Fisher, L. D., Sipols, A. J., Woods, S. C., Steil, G. M., & Porte, D. (1991). Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. *The Journal of Clinical Investigation*, *88*(4), 1272–1281.
- Schwartz, M. W., Figlewicz, D. P., Baskin, D. G., Woods, S. C., & Porte Jr, D. (1992). Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocrine Reviews*, *13*(3), 387–414.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte Jr, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, *404*(6778), 661–671.
- Sędzikowska, A., & Szablewski, L. (2021). Insulin and insulin resistance in Alzheimer’s disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(18), 9987.
- Sekino, Y., Kojima, N., & Shirao, T. (2007). Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry International*, *51*(2–4), 92–104.
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer’s disease is a synaptic failure. *Science*, *298*(5594), 789–791.
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, *8*(6), 595–608.
- Semyanov, A., & Verkhratsky, A. (2021). Astrocytic processes: from tripartite synapses to the active milieu. *Trends in Neurosciences*, *44*(10), 781–792.
- Serrano, F. G., Tapia-Rojas, C., J Carvajal, F., Cisternas, P., Viayna, E., Sola, I., Munoz-Torrero, D., & C Inestrosa, N. (2016). Rhein-huprine derivatives reduce cognitive

- impairment, synaptic failure and amyloid pathology in A β PPswe/PS-1 mice of different ages. *Current Alzheimer Research*, 13(9), 1017–1029.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schiossmacher, M., Whaley, J., & Swindlehurst, C. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature*, 359(6393), 325–327.
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., & Ling, Y. (2016). The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 537(7618), 50–56.
- Shao, C. Y., Mirra, S. S., Sait, H. B. R., Sacktor, T. C., & Sigurdsson, E. M. (2011). Postsynaptic degeneration as revealed by PSD-95 reduction occurs after advanced A β and tau pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 122, 285–292.
- Sheng, M., & Kim, E. (2011). The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a005678.
- Sherwood, C. C., Stimpson, C. D., Raghanti, M. A., Wildman, D. E., Uddin, M., Grossman, L. I., Goodman, M., Redmond, J. C., Bonar, C. J., & Erwin, J. M. (2006). Evolution of increased glia–neuron ratios in the human frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13606–13611.
- Shi, H., Wang, Q., Zheng, M., Hao, S., Lum, J. S., Chen, X., Huang, X.-F., Yu, Y., & Zheng, K. (2020). Supplement of microbiota-accessible carbohydrates prevents neuroinflammation and cognitive decline by improving the gut microbiota–brain axis in diet-induced obese mice. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1–21.
- Shi, M., Chu, F., Zhu, F., & Zhu, J. (2022). Impact of anti-amyloid- β monoclonal antibodies on the pathology and clinical profile of Alzheimer's disease: a focus on aducanumab and lecanemab. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14.
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S. R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D. M., Miller, C. A., Strickland, D. K., & Ghiso, J. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor–related protein-1 at the blood-brain barrier. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(12), 1489–1499.
- Shim, K. S., & Lubec, G. (2002). Drebrin, a dendritic spine protein, is manifold decreased in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuroscience Letters*, 324(3), 209–212.

- Shohami, E., & Biegon, A. (2014). Novel approach to the role of NMDA receptors in traumatic brain injury. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 13(4), 567–573.
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., Tsirka, S. E., & Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7(4), 483–495.
- Sierra, A., Paolicelli, R. C., & Kettenmann, H. (2019). Cien Años de Microglía: Milestones in a century of microglial research. *Trends in Neurosciences*, 42(11), 778–792.
- Sikanyika, N. L., Parkington, H. C., Smith, A. I., & Kuruppu, S. (2019). Powering amyloid beta degrading enzymes: a possible therapy for Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 44, 1289–1296.
- Silva, M. V. F., Loures, C. de M. G., Alves, L. C. V., de Souza, L. C., Borges, K. B. G., & Carvalho, M. das G. (2019). Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science*, 26, 1–11.
- Simpson, I. A., Carruthers, A., & Vannucci, S. J. (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27(11), 1766–1791.
- Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A., & Feldman, E. L. (2010). How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nature Reviews Neurology*, 6(10), 551–559.
- Sindi, I. A., Tannenber, R. K., & Dodd, P. R. (2014). A role for the neurexin–neuroligin complex in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 35(4), 746–756.
- Singh, A., & Abraham, W. C. (2017). Astrocytes and synaptic plasticity in health and disease. *Experimental Brain Research*, 235, 1645–1655.
- Sinyor, B., Mineo, J., & Ochner, C. (2020). Alzheimer's disease, inflammation, and the role of antioxidants. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 4(1), 175–183.
- Sisodia, S. S., Koo, E. H., Beyreuther, K., Unterbeck, A., & Price, D. L. (1990). Evidence that β -amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science*, 248(4954), 492–495.
- Sjöholm, Å., & Nyström, T. (2006). Inflammation and the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 22(1), 4–10.

- Smith, L. M., & Strittmatter, S. M. (2017). Binding sites for amyloid- β oligomers and synaptic toxicity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(5), a024075.
- Smith, P. J., & Blumenthal, J. A. (2010). Diet and neurocognition: review of evidence and methodological considerations. *Current Aging Science*, 3(1), 57–66.
- Sofroniew, M. v. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638–647.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119, 7–35.
- Sola, I., Aso, E., Frattini, D., López-González, I., Espargaro, A., Sabaté, R., Di Pietro, O., Luque, F. J., Clos, M. V., & Ferrer, I. (2015). Novel levetiracetam derivatives that are effective against the Alzheimer-like phenotype in mice: synthesis, in vitro, ex vivo, and in vivo efficacy studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(15), 6018–6032.
- Sola, I., Viayna, E., Gómez, T., Galdeano, C., Cassina, M., Camps, P., Romeo, M., Diomede, L., Salmona, M., & Franco, P. (2015). Multigram synthesis and in vivo efficacy studies of a novel multitarget anti-Alzheimer's compound. *Molecules*, 20(3), 4492–4515.
- Söllvander, S., Nikitidou, E., Brolin, R., Söderberg, L., Sehlin, D., Lannfelt, L., & Erlandsson, A. (2016). Accumulation of amyloid- β by astrocytes result in enlarged endosomes and microvesicle-induced apoptosis of neurons. *Molecular Neurodegeneration*, 11(1), 1–19.
- Söllvander, S., Nikitidou, E., Gallasch, L., Zyśk, M., Söderberg, L., Sehlin, D., Lannfelt, L., & Erlandsson, A. (2018). The A β protofibril selective antibody mAb158 prevents accumulation of A β in astrocytes and rescues neurons from A β -induced cell death. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 1–15.
- Song, G. J., Jung, M., Kim, J.-H., Park, H., Rahman, M. H., Zhang, S., Zhang, Z.-Y., Park, D. H., Kook, H., & Lee, I.-K. (2016). A novel role for protein tyrosine phosphatase 1B as a positive regulator of neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 1–14.
- Song, G. J., Kim, J., Kim, J.-H., Song, S., Park, H., Zhang, Z.-Y., & Suk, K. (2016). Comparative analysis of protein tyrosine phosphatases regulating microglial activation. *Experimental Neurobiology*, 25(5), 252.
- Sontag, J.-M., & Sontag, E. (2014). Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, 16.

- Sorbi, S., Bird, E. D., & Blass, J. P. (1983). Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *13*(1), 72–78.
- Soto-Mercado, V., Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., Lopera, F., & Jimenez-Del-Rio, M. (2020). Cholinergic-like neurons carrying PSEN1 E280A mutation from familial Alzheimer's disease reveal intraneuronal sAPP β fragments accumulation, hyperphosphorylation of TAU, oxidative stress, apoptosis and Ca²⁺ dysregulation: Therapeutic implications. *PLoS One*, *15*(5), e0221669.
- Spencer, J. P. E., Vafeiadou, K., Williams, R. J., & Vauzour, D. (2012). Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Molecular Aspects of Medicine*, *33*(1), 83–97.
- Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., Iwatsubo, T., Jack Jr, C. R., Kaye, J., & Montine, T. J. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *7*(3), 280–292.
- Spillane, J. A., Curzon, G., Meier-Ruge, W., White, P., Goodhardt, M. J., Iwango, P., Davison, A. N., & Bowen, D. M. (1979). Accelerated ageing or selective neuronal loss as an important cause of dementia? *The Lancet*, *313*(8106), 11–14.
- Spilovska, K., Korabecny, J., Nepovimova, E., Dolezal, R., Mezeiova, E., Soukup, O., & Kuca, K. (2017). Multitarget tacrine hybrids with neuroprotective properties to confront Alzheimer's disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *17*(9), 1006–1026.
- Spires, T. L., Meyer-Luehmann, M., Stern, E. A., McLean, P. J., Skoch, J., Nguyen, P. T., Bacskai, B. J., & Hyman, B. T. (2005). Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *Journal of Neuroscience*, *25*(31), 7278–7287.
- Spires-Jones, T. L., Meyer-Luehmann, M., Osetek, J. D., Jones, P. B., Stern, E. A., Bacskai, B. J., & Hyman, B. T. (2007). Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model. *The American Journal of Pathology*, *171*(4), 1304–1311.
- Spires-Jones, T. L., Mielke, M. L., Rozkalne, A., Meyer-Luehmann, M., de Calignon, A., Bacskai, B. J., Schenk, D., & Hyman, B. T. (2009). Passive immunotherapy rapidly increases structural plasticity in a mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease*, *33*(2), 213–220.

- Steen, E., Terry, B. M., J Rivera, E., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's Disease*, 7(1), 63–80.
- Stern, Y., & Barulli, D. (2019). Cognitive reserve. *Handbook of Clinical Neurology*, 167, 181–190.
- Stockhorst, U., de Fries, D., Steingrueber, H.-J., & Scherbaum, W. A. (2004). Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiology & Behavior*, 83(1), 47–54.
- Stockhorst, U., Gritzmann, E., Klopp, K., Schottenfeld-Naor, Y., Hubinger, A., Berresheim, H.-W., Steingruber, H.-J., & Gries, F. A. (1999). Classical conditioning of insulin effects in healthy humans. *Psychosomatic Medicine*, 61(4), 424–435.
- Stolp, H. B., & Dziegielewska, K. M. (2009). Role of developmental inflammation and blood–brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 35(2), 132–146.
- Suzuki, R., Tobe, K., Aoyama, M., Inoue, A., Sakamoto, K., Yamauchi, T., Kamon, J., Kubota, N., Terauchi, Y., & Yoshimatsu, H. (2004). Both insulin signaling defects in the liver and obesity contribute to insulin resistance and cause diabetes in *irs2*–/–mice. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25039–25049.
- Swanson, C. J., Zhang, Y., Dhadda, S., Wang, J., Kaplow, J., Lai, R. Y. K., Lannfelt, L., Bradley, H., Rabe, M., & Koyama, A. (2021). A randomized, double-blind, phase 2b proof-of-concept clinical trial in early Alzheimer's disease with lecanemab, an anti-A β protofibril antibody. *Alzheimer's Research & Therapy*, 13(1), 1–14.
- Syed, Y. Y. (2020). Sodium oligomannate: first approval. *Drugs*, 80(4), 441–444.

T

- Tackenberg, C., & Nitsch, R. M. (2019). The secreted APP ectodomain sAPP α , but not sAPP β , protects neurons against A β oligomer-induced dendritic spine loss and increased tau phosphorylation. *Molecular Brain*, 12, 1–4.
- Takeuchi, M., Sato, T., Takino, J., Kobayashi, Y., Furuno, S., Kikuchi, S., & Yamagishi, S. (2007). Diagnostic utility of serum or cerebrospinal fluid levels of toxic advanced glycation end-products (TAGE) in early detection of Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, 69(6), 1358–1366.

- Tan, C. K., Zhuang, Y., & Wahli, W. (2017). Synthetic and natural Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) agonists as candidates for the therapy of the metabolic syndrome. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(3), 333–348.
- Tan, N. S., Vázquez-Carrera, M., Montagner, A., Sng, M. K., Guillou, H., & Wahli, W. (2016). Transcriptional control of physiological and pathological processes by the nuclear receptor PPAR beta/delta. *Progress in Lipid Research*, 64, 98–122.
- Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., & Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), 85–96.
- Tanokashira, D., Wang, W., Maruyama, M., Kuroiwa, C., White, M. F., & Taguchi, A. (2021). Irs2 deficiency alters hippocampus-associated behaviors during young adulthood. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 559, 148–154.
- Tariot, P. N., Farlow, M. R., Grossberg, G. T., Graham, S. M., McDonald, S., Gergel, I., Group, M. S., & Group, M. S. (2004). Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *Jama*, 291(3), 317–324.
- Taylor, H. A., Przemyska, L., Clavane, E. M., & Meakin, P. J. (2022). BACE1: More than just a β -secretase. *Obesity Reviews*, 23(7), e13430.
- Teimouri, M., Hosseini, H., ArabSadeghabadi, Z., Babaei-Khorzoughi, R., Gorgani-Firuzjaee, S., & Meshkani, R. (2022). The role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 1–16.
- Tekkök, S. B., Brown, A. M., Westenbroek, R., Pellerin, L., & Ransom, B. R. (2005). Transfer of glycogen-derived lactate from astrocytes to axons via specific monocarboxylate transporters supports mouse optic nerve activity. *Journal of Neuroscience Research*, 81(5), 644–652.
- Tilleux, S., & Hermans, E. (2007). Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *Journal of Neuroscience Research*, 85(10), 2059–2070.
- Tilley, J. W., & Kramer, M. J. (1981). 1 Aminoadamantane Derivatives. *Progress in Medicinal Chemistry*, 18, 1–44.
- Tokarz, V. L., MacDonald, P. E., & Klip, A. (2018). The cell biology of systemic insulin function. *Journal of Cell Biology*, 217(7), 2273–2289.

- Tolppanen, A.-M., Ngandu, T., Kåreholt, I., Laatikainen, T., Rusanen, M., Soininen, H., & Kivipelto, M. (2014). Midlife and late-life body mass index and late-life dementia: results from a prospective population-based cohort. *Journal of Alzheimer's Disease*, *38*(1), 201–209.
- Tong, M., Deochand, C., Didsbury, J., & de la Monte, S. M. (2016). T3D-959: A multi-faceted disease remedial drug candidate for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *51*(1), 123–138.
- Tong, M., Dominguez, C., Didsbury, J., & de la Monte, S. M. (2016). Targeting Alzheimer's disease neuro-metabolic dysfunction with a small molecule nuclear receptor agonist (T3D-959) reverses disease pathologies. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*, *6*(3).
- Toral-Rios, D., Pichardo-Rojas, P. S., Alonso-Vanegas, M., & Campos-Peña, V. (2020). GSK3 β and tau protein in Alzheimer's Disease and epilepsy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 19.
- Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (1995). Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *The FASEB Journal*, *9*(15), 1570–1576.
- Tumminia, A., Vinciguerra, F., Parisi, M., & Frittitta, L. (2018). Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease: role of insulin signalling and therapeutic implications. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11), 3306.

U

- Unger, J., McNeill, T. H., Moxley III, R. T., White, M., Moss, A., & Livingston, J. N. (1989). Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience*, *31*(1), 143–157.
- United Nations Ny. Department of Economic and Social Affairs, N. Y. (2002). *World Population Ageing, 1950-2050*. United Nations Publications.

V

- Vagelatos, N. T., & Eslick, G. D. (2013). Type 2 diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: the confounders, interactions, and neuropathology associated with this relationship. *Epidemiologic Reviews*, *35*(1), 152–160.
- Vallée, A., & Lecarpentier, Y. (2016). Alzheimer disease: crosstalk between the canonical Wnt/beta-catenin pathway and PPARs alpha and gamma. *Frontiers in Neuroscience*, *10*, 459.

- van Dam, D., d'Hooge, R., Staufenbiel, M., van Ginneken, C., van Meir, F., & de Deyn, P. P. (2003). Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *European Journal of Neuroscience*, *17*(2), 388–396.
- van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., Kanekiyo, M., Li, D., Reyderman, L., & Cohen, S. (2023). Lecanemab in early Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, *388*(1), 9–21.
- Vassar, R. (2004). Bace 1: The β -secretase enzyme in alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, *23*, 105–113.
- Vecchio, I., Sorrentino, L., Paoletti, A., Marra, R., & Arbitrio, M. (2021). The state of the art on acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Central Nervous System Disease*, *13*, 11795735211029112.
- Venneti, S., Wiley, C. A., & Kofler, J. (2009). Imaging microglial activation during neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *4*, 227–243.
- Ventura, R., & Harris, K. M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *Journal of Neuroscience*, *19*(16), 6897–6906.
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2014). Astroglial cradle in the life of the synapse. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1654), 20130595.
- Verkhatsky, A., Parpura, V., Rodriguez-Arellano, J. J., & Zorec, R. (2019). Astroglia in Alzheimer's disease. *Neuroglia in Neurodegenerative Diseases*, 273–324.
- Verma, M., Vats, A., & Taneja, V. (2015). Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. *Annals of Indian Academy of Neurology*, *18*(2), 138.
- Verri, M., Pastoris, O., Dossena, M., Aquilani, R., Guerriero, F., Cuzzoni, G., Venturini, L., Ricevuti, G., & Bongiorno, A. I. (2012). Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *25*(2), 345–353.
- Viayna, E., Coquelle, N., Cieslikiewicz-Bouet, M., Cisternas, P., Oliva, C. A., Sánchez-López, E., Ettcheto, M., Bartolini, M., De Simone, A., & Ricchini, M. (2020). Discovery of a potent dual inhibitor of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with antioxidant activity that alleviates Alzheimer-like pathology in old APP/PS1 mice. *Journal of Medicinal Chemistry*, *64*(1), 812–839.

- Viayna, E., Sola, I., Bartolini, M., De Simone, A., Tapia-Rojas, C., Serrano, F. G., Sabaté, R., Juárez-Jiménez, J., Perez, B., & Luque, F. J. (2014). Synthesis and multitarget biological profiling of a novel family of rhein derivatives as disease-modifying anti-Alzheimer agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*(6), 2549–2567.
- Viayna, E., Sola, I., di Pietro, O., & Munoz-Torrero, D. (2013). Human disease and drug pharmacology, complex as real life. *Current Medicinal Chemistry*, *20*(13), 1623–1634.
- Vieira, M. N. N., Lyra e Silva, N. M., Ferreira, S. T., & De Felice, F. G. (2017). Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): a potential target for Alzheimer's therapy? *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*, 7.
- Viola, K. L., & Klein, W. L. (2015). Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathologica*, *129*, 183–206.
- Vogels, T., Murgoci, A.-N., & Hromádka, T. (2019). Intersection of pathological tau and microglia at the synapse. *Acta Neuropathologica Communications*, *7*, 1–25.
- Voskuhl, R. R., Peterson, R. S., Song, B., Ao, Y., Morales, L. B. J., Tiwari-Woodruff, S., & Sofroniew, M. v. (2009). Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *Journal of Neuroscience*, *29*(37), 11511–11522.

W

- Walker, C. K., & Herskowitz, J. H. (2021). Dendritic spines: Mediators of cognitive resilience in aging and Alzheimer's disease. *The Neuroscientist*, *27*(5), 487–505.
- Walker, D. G., Dalsing-Hernandez, J. E., Campbell, N. A., & Lue, L.-F. (2009). Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: a potential mechanism leading to chronic inflammation. *Experimental Neurology*, *215*(1), 5–19.
- Walker, D. G., Tang, T. M., & Lue, L.-F. (2018). Increased expression of toll-like receptor 3, an anti-viral signaling molecule, and related genes in Alzheimer's disease brains. *Experimental Neurology*, *309*, 91–106.
- Walker, J. M., Dixit, S., Saulsberry, A. C., May, J. M., & Harrison, F. E. (2017). Reversal of high fat diet-induced obesity improves glucose tolerance, inflammatory response, β -amyloid accumulation and cognitive decline in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *100*, 87–98.

- Wallace, T. L., & Porter, R. H. P. (2011). Targeting the nicotinic alpha7 acetylcholine receptor to enhance cognition in disease. *Biochemical Pharmacology*, *82*(8), 891–903.
- Wang, D., Yan, J., Chen, J., Wu, W., Zhu, X., & Wang, Y. (2015). Naringin improves neuronal insulin signaling, brain mitochondrial function, and cognitive function in high-fat diet-induced obese mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *35*, 1061–1071.
- Wang, H., Sun, X., Zhang, N., Ji, Z., Ma, Z., Fu, Q., Qu, R., & Ma, S. (2017). Ferulic acid attenuates diabetes-induced cognitive impairment in rats via regulation of PTP1B and insulin signaling pathway. *Physiology & Behavior*, *182*, 93–100.
- Wang, S., & Colonna, M. (2019). Microglia in Alzheimer's disease: a target for immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*, *106*(1), 219–227.
- Wang, W.-Y., Tan, M.-S., Yu, J.-T., & Tan, L. (2015). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine*, *3*(10).
- Wang, X., Sun, G., Feng, T., Zhang, J., Huang, X., Wang, T., Xie, Z., Chu, X., Yang, J., & Wang, H. (2019). Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression. *Cell Research*, *29*(10), 787–803.
- Wang, X., Yu, S., Hu, J.-P., Wang, C.-Y., Wang, Y., Liu, H.-X., & Liu, Y.-L. (2014). Streptozotocin-induced diabetes increases amyloid plaque deposition in AD transgenic mice through modulating AGEs/RAGE/NF- κ B pathway. *International Journal of Neuroscience*, *124*(8), 601–608.
- Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(1), 22–35.
- Wang, Y.-X. (2010). PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Research*, *20*(2), 124–137.
- Wang, Y.-X., Zhang, C.-L., Yu, R. T., Cho, H. K., Nelson, M. C., Bayuga-Ocampo, C. R., Ham, J., Kang, H., & Evans, R. M. (2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ . *PLoS Biology*, *2*(10), e294.
- Wang, Z.-X., Tan, L., Liu, J., & Yu, J.-T. (2016). The essential role of soluble A β oligomers in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, *53*, 1905–1924.

- Watkins, P. B., Zimmerman, H. J., Knapp, M. J., Gracon, S. I., & Lewis, K. W. (1994). Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *Jama*, *271*(13), 992–998.
- Weinstock, M., & Shoham, S. (2004). Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity. *Journal of Neural Transmission*, *111*, 347–366.
- Weise, C. M., Chen, K., Chen, Y., Kuang, X., Savage, C. R., Reiman, E. M., & Initiative, A. D. N. (2018). Left lateralized cerebral glucose metabolism declines in amyloid- β positive persons with mild cognitive impairment. *NeuroImage: Clinical*, *20*, 286–296.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., & Couraud, P.-O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1788*(4), 842–857.
- Więckowska-Gacek, A., Mietelska-Porowska, A., Chutorański, D., Wydrych, M., Długosz, J., & Wojda, U. (2021). Western diet induces impairment of liver-brain axis accelerating neuroinflammation and amyloid pathology in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*, 654509.
- Williams, P., Sorribas, A., & Howes, M.-J. R. (2011). Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Natural Product Reports*, *28*(1), 48–77.
- Winblad, B., Jones, R. W., Wirth, Y., Stöffler, A., & Möbius, H. J. (2007). Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *24*(1), 20–27.
- Winblad, B., & Machado, J. C. (2008). Use of rivastigmine transdermal patch in the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *5*(12), 1377–1386.
- Wójtowicz, S., Strosznajder, A. K., Jeżyna, M., & Strosznajder, J. B. (2020). The novel role of PPAR alpha in the brain: promising target in therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neurochemical Research*, *45*, 972–988.
- Wolk, D., & Vaishnavi, S. (2016). Mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *International Neurology*, 133–139.
- Woods, S. C., & Porte Jr, D. (1977). Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, *233*(4), E331.

- Wu, G.-M., & Hou, X.-Y. (2010). Oligomerized A β 25–35 induces increased tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunit 2A in rat hippocampal CA1 subfield. *Brain Research*, 1343, 186–193.
- Wu, L., Rosa-Neto, P., Hsiung, G.-Y. R., Sadovnick, A. D., Masellis, M., Black, S. E., Jia, J., & Gauthier, S. (2012). Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 39(4), 436–445.
- Wu, W.-Y., Dai, Y.-C., Li, N.-G., Dong, Z.-X., Gu, T., Shi, Z.-H., Xue, X., Tang, Y.-P., & Duan, J.-A. (2017). Novel multitarget-directed tacrine derivatives as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 572–587.
- Wyss-Coray, T., Loike, J. D., Brionne, T. C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S. C., & Husemann, J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid- β in vitro and in situ. *Nature Medicine*, 9(4), 453–457.

X

- Xia, X., Jiang, Q., McDermott, J., & Han, J. J. (2018). Aging and Alzheimer's disease: comparison and associations from molecular to system level. *Aging Cell*, 17(5), e12802.
- Xiao, X. Q., Zhang, H. Y., & Tang, X. C. (2002). Huperzine A attenuates amyloid β -peptide fragment 25-35-induced apoptosis in rat cortical neurons via inhibiting reactive oxygen species formation and caspase-3 activation. *Journal of Neuroscience Research*, 67(1), 30–36.
- Xie, J., Wang, M., Long, Z., Ning, H., Li, J., Cao, Y., Liao, Y., Liu, G., Wang, F., & Pan, A. (2022). Global burden of type 2 diabetes in adolescents and young adults, 1990–2019: systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Bmj*, 379.
- Xin, S.-H., Tan, L., Cao, X., Yu, J.-T., & Tan, L. (2018). Clearance of amyloid beta and tau in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapy. *Neurotoxicity Research*, 34, 733–748.
- Xiong, H., Callaghan, D., Wodzinska, J., Xu, J., Premyslova, M., Liu, Q.-Y., Connelly, J., & Zhang, W. (2011). Biochemical and behavioral characterization of the double transgenic mouse model (APP^{swe}/PS1^{dE9}) of Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 27(4).
- Xiuli, G., Meiyu, G., & Guanhua, D. (2005). Glucose transporter 1, distribution in the brain and in neural disorders: its relationship with transport of neuroactive drugs through the blood-brain barrier. *Biochemical Genetics*, 43(3–4), 175.

Y

- Yan, P., Hu, X., Song, H., Yin, K., Bateman, R. J., Cirrito, J. R., Xiao, Q., Hsu, F. F., Turk, J. W., & Xu, J. (2006). Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid- β fibrils in vitro and compact plaques in situ. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(34), 24566–24574.
- Yan, Q., Zhang, J., Liu, H., Babu-Khan, S., Vassar, R., Biere, A. L., Citron, M., & Landreth, G. (2003). Anti-inflammatory drug therapy alters β -amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *23*(20), 7504–7509.
- Yang, L., Zhang, X., Li, S., Wang, H., Zhang, X., Liu, L., & Xie, A. (2020). Intranasal insulin ameliorates cognitive impairment in a rat model of Parkinson's disease through Akt/GSK3 β signaling pathway. *Life Sciences*, *259*, 118159.
- Yang, X., Sun, G., Yang, C., & Wang, B. (2011). Novel rhein analogues as potential anticancer agents. *ChemMedChem*, *6*(12), 2294–2301.
- Yang, Z., Wu, F., He, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Zhou, G., Yang, H., & Zhou, P. (2018). A novel PTP1B inhibitor extracted from *Ganoderma lucidum* ameliorates insulin resistance by regulating IRS1-GLUT4 cascades in the insulin signaling pathway. *Food & Function*, *9*(1), 397–406.
- Yasumatsu, N., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Noguchi, J., & Kasai, H. (2008). Principles of long-term dynamics of dendritic spines. *Journal of Neuroscience*, *28*(50), 13592–13608.
- Yoon, S.-S., & Jo, S. A. (2012). Mechanisms of amyloid- β peptide clearance: potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Biomolecules & Therapeutics*, *20*(3), 245.
- Young, M. E., Ohm, D. T., Dumitriu, D., Rapp, P. R., & Morrison, J. H. (2014). Differential effects of aging on dendritic spines in visual cortex and prefrontal cortex of the rhesus monkey. *Neuroscience*, *274*, 33–43.
- Yu, H.-J., & Koh, S.-H. (2017). The role of PI3K/AKT pathway and its therapeutic possibility in Alzheimer's disease. *Hanyang Medical Reviews*, *37*(1), 18–24.
- Yuksel, M., & Tacal, O. (2019). Trafficking and proteolytic processing of amyloid precursor protein and secretases in Alzheimer's disease development: an up-to-date review. *European Journal of Pharmacology*, *856*, 172415.

Zajaczkowski, W., Frankiewicz, T., Parsons, C. G., & Danysz, W. (1997). Uncompetitive NMDA receptor antagonists attenuate NMDA-induced impairment of passive avoidance learning and LTP. *Neuropharmacology*, *36*(7), 961–971.

Z

Zeiger, E., Erexson, G., Mortelmans, K., & Thilagar, A. (1997). Genetic toxicity studies of 1, 2, 3, 4-tetrahydro-9-acridinamine (tacrine). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *393*(3), 189–197.

Zhang, F., & Jiang, L. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 243–256.

Zhang, H., Gao, Y., Qiao, P., Zhao, F., & Yan, Y. (2015). PPAR- α agonist regulates amyloid- β generation via inhibiting BACE-1 activity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells transfected with APP_{swe} gene. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *408*, 37–46.

Zhang, X., Shen, X., Dong, J., Liu, W.-C., Song, M., Sun, Y., Shu, H., Towse, C.-L., Liu, W., & Liu, C.-F. (2019). Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate ameliorates learning and memory impairment through upregulating CRTC1 and synaptophysin in ischemic stroke rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *39*, 1151–1163.

Zhang, Y., Huang, N., Yan, F., Jin, H., Zhou, S., Shi, J., & Jin, F. (2018). Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: GSK-3 β as a potential link. *Behavioural Brain Research*, *339*, 57–65.

Zhang, Z., Chen, N., Liu, J., Wu, J., Zhang, J., Zhang, Y., & Jiang, X. (2014). Protective effect of resveratrol against acute lung injury induced by lipopolysaccharide via inhibiting the myd88-dependent Toll-like receptor 4 signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, *10*(1), 101–106.

Zhao, H., Alam, A., San, C.-Y., Eguchi, S., Chen, Q., Lian, Q., & Ma, D. (2017). Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: recent developments. *Brain Research*, *1665*, 1–21.

Zheng, H., & Koo, E. H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration*, *1*, 1–12.

Zhou, S., Yu, G., Chi, L., Zhu, J., Zhang, W., Zhang, Y., & Zhang, L. (2013). Neuroprotective effects of edaravone on cognitive deficit, oxidative stress and tau hyperphosphorylation induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Neurotoxicology*, *38*, 136–145.

- Zhu, R., Chen, M., Zhang, Z., Wu, T., & Zhao, W.-H. (2021). Dietary fatty acids and risk for Alzheimer's disease, dementia, and mild cognitive impairment: a prospective cohort meta-analysis. *Nutrition, 90*, 111355.
- Zhu, X., Su, B., Wang, X., Smith, M. A., & Perry, G. (2007). Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cellular and Molecular Life Sciences, 64*, 2202–2210.
- Zou, X. H., Sun, L. H., Yang, W., Li, B. J., & Cui, R. J. (2020). Potential role of insulin on the pathogenesis of depression. *Cell Proliferation, 53*(5), e12806.