



Universidad de Navarra

Facultad de Farmacia

**Regulación del transportador de glutamato 1 (VGLUT1)
en situaciones de resistencia a insulina: Implicación en la
Enfermedad de Alzheimer**

Manuel Rodríguez Perdigón

**Regulación del transportador de glutamato 1 (VGLUT1)
en situaciones de resistencia a insulina: Implicación en la
Enfermedad de Alzheimer**

Memoria presentada por D^o MANUEL RODRÍGUEZ PERDIGÓN para aspirar al
grado de Doctor por la Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Farmacología y Toxicología y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, Julio de 2015

Fdo.Prof. Dra. MARÍA JAVIER RAMÍREZ GIL

Fdo.Prof. Dra. MAITE SOLAS ZUBIAURRE

*“Si donde vas no sabes lo que quieres encontrar,
no sabrás cuán perdido estás”*

El señor Ignacio (Añoover de Tormes, Salamanca)

AGRADECIMIENTOS

Estas páginas son en agradecimiento por todos los que me habéis acompañado durante estos 5 últimos años. Mirando hacia atrás, todo ha parecido un soplo. Espero haber sabido capaz de agradecer cada gesto en el momento adecuado y poder recoger en estas líneas al menos una parte de mi cariño y gratitud hacia vosotros.

Tengo que agradecer a la Universidad de Navarra en todo su conjunto por darme la oportunidad, de alguna manera, de anclarme en ella para realizar esta tesis doctoral. Quiero hacer hincapié en que este trabajo no hubiera sido posible sin la financiación del Instituto de Salud Carlos III (FI11/00237), del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España. Espero que en los futuros años haya un mayor apoyo organizativo y económico tanto de carácter privado como público a los distintos segmentos de la investigación española.

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras Mariaja y Maite ó Maite y Mariaja, todo vuestro tiempo, capacidad de trabajo, esfuerzo, cariño y dedicación "creativa" a esta tesis. Sin duda, habéis sido padres de esta tesis. De sobra lo sabéis. Estáis abocadas a seguir con el buen tándem que hacéis. Quiero agradecerte Mariaja tu disposición a acogerme en el depar desde que nos conocimos por primera vez en Mayo de 2010, sin conocerme de nada. No tengo hechos o palabras para agradecértelo pero sí estoy seguro que no lo echaré al olvido. Quiero agradecerte Maite, el tiempo útil, tus muestras de cariño, disposición y el seguimiento que has tenido conmigo. Agradecerte tu rigor científico y "buen hacer" porque me ha hecho aprender. Además estoy seguro que Josu ha tenido también algo que ver en esto. "Ya queda menos, Maite". Mucha suerte. Espero os hayais nutrido de esta experiencia como yo lo he hecho.

Agradecer a Berta Lasheras su interés y apoyo desde el primer día que llegué al depar. No se me olvidará la primera "entrevista" que tuvimos en la que me sentí muy acogido. Espero que disfrutes de tu merecido descanso tras todos estos años de trabajo.

Al depar de "Farma" porque no sólo pareceis sino que sois el mejor de los "depar". Siempre habéis sido como "una familia". Qué puedo más decir acerca de los buenos momentos, risas, apoyo y cariño que "se respira" en los cafés. A Xabi, porque por "la cagada se conoce al pájaro". Un placer haber sido compañero de batalla. Gracias por ser único en

nuestra especie. Te voy a echar mucho menos. A mi preferida, Mikel. Bien sabes que a “la mujer barbuda no se le cambia por ninguna”. Gracias por hacer más ameno el día a día en el depar. A Merche por tu ayuda y cariño. Siempre se hace más llevadera la travesía con personas como tú. Ya queda menos para la tesis y para ampliar familia. Enhorabuena. A Irene por los ratos y confianzas compartidas. Mucha suerte con lo que viene. A las futuras glorias del depar: Hilda y Silvia porque lo mejor está por llegar. Estoy seguro que haréis muy buen dúo dentro y fuera del depar.

A Mari Luz, porque “a falta de pan, buenas son tortas”. Siempre tan “polivalente” para todo. Bien sabes y aunque no estés por allí, eres esencial en el depar. Siempre te recuerdo con una sonrisa en la cara y cuando no, por tus reprimendas. Gracias por tu ayuda y cariño. A Trini por tu breve pero agradable paso por el depar. A Pili, por ser tan atenta, cariñosa y eficiente. Ya sabes que tu “despedida” fue un “hasta luego”. Espero verte pronto porque estoy seguro que te dejarás caer por los arribes del Duero. A Sandra, porque cuando “la limosna es tanta, hasta el Santo desconfía”. No sé cómo agradecerte tu cariño y ayuda. Echaré de menos nuestras conversaciones. Has sido toda una entrega tanto como persona como en trabajo. A Elena Puerta, porque “la vela que va por delante es la que alumbra”. Gracias por tu entusiasmo, disposición y muestras de ánimo. No dejes de sonreír. A Bea por tus confianzas y charlas. Creo que voy a echar de menos todo el ritual de dar prácticas. Disfruté un montón mientras todo duró. Mucha suerte con los 3 “peques”. A Rosa porque contigo “la dicha siempre es buena”. Gracias por tus muestras de cariño, ayuda, disposición y atención humana. No lo olvidaré. A Popi porque sin llegar a compartir mucho tiempo contigo, se me hizo muy cercana tu presencia. A Luis y a Idoia por compartir tiempo y charlas en los cafés. A Guada por ser siempre tan atenta y alegre conmigo. Al final me voy a quedar con las ganas de conocer a tus niñas. Mucha suerte. A Pepe por ser la atención y amabilidad personificada. Echaré de menos esas charlas contigo. Aún así, espero mantengas los 3.50 min/km. Un reto imposible para mí cuando tenga tu edad. A Elena Beltrán que aunque lleves “poco” en el depar, espero que sea por mucho más tiempo. Agradecerte tu ayuda y tiempo. Ya queda menos para el que “viene en camino”. Enhorabuena.

A las viejas glorias con las que compartí o no laboratorio porque cualquier tiempo pasado fue mejor (o no). A Bárbara, por hacer de “cicerone” dentro y fuera del “depar”. Todavía me da vueltas la cabeza en “el pulpo-atracción de feria” de Villaba. A Gorki: fue un

placer compartir laboratorio contigo. Creo que no acabamos tan locos como decías. Mucha suerte con la pequeña y el postdoc en Suecia. A Eva. No olvidaré esos pasos de “salsa” o aquellos primeros pasos haciendo comportamiento en CIFA. Mucha suerte en Pamplona. A Marta por tu paciencia y ayuda en mis comienzos en el depar. No olvidaré tu momento “Marta-manos-tijeras”. Nos veremos seguro por Pamplona o alrededores. A Eli. No te lo he dicho pero echo de menos a “Yogui” y ya no hago uso de los prismáticos. Espero que el que viene (Aimar) sea tan simpático y alegre como tú. A Lucía. Porque fue “muy bonito” compartir laboratorio, mientras duró. Espero nos veamos por Narón. A Lur. Por hablarme del mar, marinera. Me alegro de tu felicidad venida a más. Nos veremos quién sabe dónde. A Vero porque el poco tiempo que compartimos laboratorio fuiste tan simpática y agradable conmigo. A Álvaro que aunque no te conozca bien parece que esta tesis germinó en parte gracias a ti. A Patxi por poner la gracia en la “ciencia”. Echaré de menos tus “comments” oportunos en el sentido científico y jocoso. A María Larriva porque “más vale ciento volando que pájaro en mano”. Un placer aprender de ti fuera y dentro del laboratorio. Sólo veo “post-it” tuyos por el depar. Imposible olvidarte. A Lola, por tu sensatez y “locura”. No olvidaré tu paso por el “divertí-cuarto” y aquel curso de verano en Santander.

A “masterandos” y estudiantes-estancias que han pasado por el departamento y que de alguna manera he crecido con ellos: Jamine, Frederich, Isabel, “Mery”, Miguel, Ramón, María, Gonzalo, Jorge..y seguro que alguno más que se me cae de la lista.

A la gente que trabaja en el edificio de investigación y universidad. A las del servicio de la limpieza o “de las batas” por su amabilidad y sonrisa. A los de mantenimiento por su disposición y a los “bedeles” por ser siempre tan serviciales.

A los de Fisio: Laura, Miguel, Josune, Carlos, Rosa, Leyre..y otro porrón de ellos. por vuestra sonrisa, confianzas y ayuda. Mucha suerte para lo que resta (ó suma).

A los de Bioquímica: Marina, Antonia, María, Paulo, Aitor, Álvaro, Sara, Maider, María, Gabriel... Por todo lo compartido con vosotros: charlas, juevintxos, partidos, comidas.

A los de genética por recibirme siempre con una sonrisa cuando entraba en su depar para coger “stuff de cultivos”. Gracias Javi por tu ayuda y por esas discusiones científicas de cultivos, tumores y medios celulares.

A los de Físico-Qca por ayudarme siempre que lo he necesitado. A Juana por ser tan agradable. Gracias por compartir confianzas conmigo. Espero verme pronto contigo y tu marido en un woktowalk.

Al depar de Toxi porque de alguna manera me he sentido apoyado y ayudado por ellos (Ismael, Maite, Celia ...). A Laura, a Tamara a Jose (y estudiantes-estancia) por esos juevintxos que daban mucho de sí, en todos los sentidos. Una pena no haber hecho más. Mucha suerte para todo lo que venga.

Al personal de la biblioteca de ciencias, entre ellos Arantxa. No olvidaré vuestra ayuda para aquello que he necesitado.

Agradecer a la dirección del máster "I+D+i de medicamentos" y personal relacionado por haberme dado la oportunidad de darme un punto de inflexión en mi vida académica y personal, a raíz de su realización. A Antonio Monge por tus siempre sabias palabras. A Silvia Pérez por haberme recibido mi primer día en la UNAV. No olvidaré tu atención y cariño aquel día 12 de Mayo de 2010 en el que me diste un "tour" por la universidad. A mis compañeros del máster (y viejas glorias-máster promociones pasadas) por su compañía, amistad y otros menesteres: Ari, Julia, Sonia, Javi, Ronald, Rebeca, Bea, Miriam, Adriana, Lisbeth, Rosana, Maite y Pilar. Aleix, ya queda menos campeón. Nos vemos por "Mas Bes".

A la "horda" de gente que conocí de la estancia en Estocolmo. A Ángel, por darme cobijo y enseñanza en tu laboratorio. Fue siempre un placer sentarme contigo y discutir en poyata menesteres de ciencia y no-ciencia. Aún no sé cómo agradecértelo. No olvidaré el capital humano que había en el cluster-lab: a Heela (no olvidaré tu hospitalidad durante aquellos primeros días), a María Lodeiro, Cristina, Paula, Wallid, Mustafa (Daddy cool), Martuska, Erick, Silvia Maioli, "ErickCoach", Francesca, Torbjörn, Silvia Llorente, Javi, Paula, Joana, Sara, Murad, Tobias, Bernadette, Daniela, Roberta, Enrico, Tania, Erika, Nickenza, "Chin-Chan", Sofía, "Schwarzenegger", Wang (Panda)...entre otros tantos muchos. Al "gay parade": Antonio Piras, Carlos, Dani Parreira y la facción iraní. A la gente de Jägargatan residence: un continuo ir-venir de gente que siempre acaba por nutrirte como persona. A Manu, Alberto, Max, Joao, Anne, Alicia, Baris...y a los que me dejo en el tintero.

A mis sucesivos compañeros de piso por hacerme sentir "agustico" en casa: Javi, Ignacio, Nacho-"torrijas", Jhony, Jesús Rivas, Kike y Gonzalo.

A mis compañeros de cordada: Jokin y Eder. Bien sabeis que las reuniones en las paredes de Etxauri están hechas para que nidifiquen las águilas de Bonelli. Un placer compartir cuerda con vosotros.

A mis compis de salidas-carreras: Miguel y Santiago (y los otros). Va a ser una pena dejar de hacer populares con vosotros por tierras navarro-vascas. Toda "carrera" tiene una meta. Me quedo con las zancadas que dimos juntos. Gracias por compartir el camino.

A Rosario, por ayudarme con tu escucha. A Aitziber por tu amistad en el tiempo.

A mis amigos de la carrera ("Fabri", "Viti", Cárđaba y Samuel). Bien sabéis que no debéis portaros como yo. A mis amigos más íntimos: José y Marco. Os sigo echando de menos en la distancia. Espero podamos coincidir para nuevas hazañas.

A mis amigos de infancia. Porque sois parte de mí aunque no entendáis muy bien lo que haga. A Mercedes porque sé que aún estás ahí.

A mi Pucky por ser tan importante y especial en mi vida.

A mis padres, a mi hermana y a mi familia que siempre han sido un pilar fundamental en mi vida.

Gracias a todos por haber hecho esto posible.

LISTA DE FÓRMULAS Y ABREVIATURAS

APP	Proteína precursora del amiloide
Aβ	péptido β -amiloide
AKT	Proteína kinasa B (PKB)
AL	Ácido lipoico
ApoE	Apolipoproteína E
BHE	Barrera hematoencefálica
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAATs	Transportador de aminoácidos excitatórios
FAD	Enfermedad de Alzheimer familiar
GLUT	Transportador de glucosa
GluA1	Subunidad de receptor AMPA
GluN2A	Subunidad de receptor NMDA
GluN2B	Subunidad de receptor NMDA
GSK-3β	Glicógeno sintetasa kinasa β
HFD	Dieta alta en grasas
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
HOMA	Modelo de evaluación homeostática
IDE	Enzima degradante de insulina
JNK	Quinasa N-terminal de la c-Jun
MCT	Transportadores de monocarboxilados
NADH	Coenzima nicotinamida adenina dinucleótido
LCR	Líquido ceforraquídeo
LTP	Potenciación a largo plazo
LTD	Depresión a largo plazo
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
ONF	Ovillo neurofibrilar
PHF	Filamentos helicoidales pareados
PKB	Proteína kinasa B
PI3-K	Fosfoinositol-3-kinasa

PSD-95	Proteína de densidad postsináptica
pTau	Tau fosforilada
mRNA	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central
STZ	Estreptozotocina
Tg2576	Ratones transgénicos (mutación <i>swedish</i> gen APP humano)
VEAT	Transportador vesicular de aminoácidos excitatorios
VGLUTs	Transportadores vesiculares de glutamato
WT	Ratones <i>wild type</i>
3xTG	Modelo transgénico de EA (triple mutación de los genes PS1, APP y tau)

ABBREVIATIONS IN ENGLISH

AD	Alzheimer's disease
AMPK	AMP activated protein kinase
AL	Lipoic acid
APP	Amyloid precursor protein
BACE	β -secretase
Aβ	Amyloid β peptide
CNS	Central nervous system
CSF	cerebrospinal fluid
DNA	deoxyribonucleic acid
FAD	Familial Alzheimer disease
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
HFD	High fat diet
HOMA	Homeostatic model assessment
IR	insulin receptor
IRS	insulin receptor substrate
LTD	Long term depression
LA	Lipoic acid
LTP	Long term potentiation
MCI	Mild cognitive impairment
MMSE	Mini-mental state examination
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MWM	Morris water maze
NORT	Novel object recognition test
NFT	Neurofibrillary tangle
O.D.	Optical density
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PSD95	Postsynaptic density protein 95
WT	Wild type
3-β-OHB	3 β -hydroxybutyrate (ketone bodie)

ÍNDICE

Capítulo I: Introducción.....	1
1. Enfermedad de Alzheimer.....	1
1.1. Definición, historia y epidemiología	1
1.2. Patogenia.....	4
1.3. Factores de riesgo.....	6
1.3.1. Factores de riesgo genéticos.....	7
1.3.2. Factores de riesgo vascular.....	7
1.3.3. Inflamación.....	7
1.3.4. Factores de riesgo metabólicos.....	8
1.3.5. Factores de riesgo ambientales.....	9
1.4. Etiología.....	9
1.5. Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.....	17
2. Metabolismo, obtención de energía y EA.....	19
2.1. Sustratos energéticos cerebrales.....	19
2.2. Insulina	20
2.2.1. Insulina y cerebro.....	21
2.2.2. Insulina y cognición.....	23
2.2.3. Resistencia a la insulina y diabetes mellitus.....	25
2.3. Cuerpos cetónicos.....	27
2.4. Insulina y Enfermedad de Alzheimer.....	29
3. Regulación de la neurotransmisión glutamatérgica modulada por insulina.....	33
3.1. El glutamato.....	33
3.2. Sistema glutamatérgico en la Enfermedad de Alzheimer.....	36
3.3. Relación entre insulina y sistema glutamatérgico	38
4. Referencias.....	42
Capítulo II: Hipótesis y objetivos.....	89
 Capítulo III: JNK: bridging the insulin signaling and VGLUT1 in Alzheimer's disease.....	 97
Abstract.....	97
1. Introduction.....	98
2. Methods.....	99
2.1. Patients and tissue samples.....	99

2.2.	Animal model of insulin resistance.....	100
2.3.	Biochemical measurements.....	100
2.3.1.	Insulin receptor mRNA levels.....	100
2.3.2.	Western blotting.....	101
2.4.	Data analysis.....	101
3.	Results.....	102
3.1.	Demographical details.....	102
3.2.	Alterations in insulin signalling in AD could be associated to JNK activation.....	102
3.3.	Insulin resistance and glutamatergic alterations in AD.....	104
3.4.	Effects of JNK inhibition in an animal model of central insulin resistance.....	104
4.	Discussion.....	105
	Acknowledgements.....	107
	References.....	108

Capítulo IV: Lipoic acid improves neuronal insulin signaling and rescues cognitive function regulating VGLUT1 expression in high-fat-fed rats: implications for Alzheimer’s disease..... 115

	Abstract.....	115
1.	Introduction.....	116
2.	Methods.....	118
2.1.	Animal and diets.....	118
2.1.1.	Tissue and blood collection.....	119
2.2.	Behavioral studies	120
2.2.1.	Locomotor activity.....	120
2.2.2.	Object recognition.....	120
2.3.	Neuronal primary cell cultures.....	121
2.4.	Biochemical measurements.....	121
2.4.1.	Plasma determinations.....	121
2.4.2.	Hippocampal levels of 3-β-hydroxybutyrate.....	122
2.4.3.	Glutamate levels.....	122
2.4.4.	Western blotting.....	122

2.5. Data analysis.....	123
3. Results.....	123
3.1. Effects of HFD and LA on cognition.....	123
3.2. HFD induced both peripheral and central insulin resistance that is reversed by LA.....	124
3.3. Effects of HFD and LA on VGLUT1 expression.....	126
3.4. 3- β -hydroxybutyrate decreases glutamate release in cell culture...	127
4. Discussion.....	128
Acknowledgements.....	133
References.....	134
Capítulo V: Down-regulation of glutamatergic terminals (VGLUT1) driven by Aβ in Alzheimer's disease.....	147
Abstract.....	147
1. Introduction.....	148
2. Material and Methods.....	150
2.1. Patients, clinical and neuropathological data and tissue processing.....	150
2.2. Animals	151
2.3. Morris Water Maze.....	151
2.4. Neuronal primary cell cultures.....	152
2.5. Glutamate levels.....	152
2.6. Peptides and soluble A β -species preparation.....	153
2.7. A β injection.....	153
2.8. Measurement of A β levels.....	153
2.9. Tissue collection.....	154
2.10. Western blotting.....	154
2.11. Immunofluorescence staining.....	155
2.12. Cresyl violet staining (Nissl).....	156
2.13. Statistical analysis.....	156
3. Results.....	156
3.1. A β alters VGLUT1 expression and glutamate release in primary cell cultures.....	156

3.2. A β alters VGLUT1 expression and cognitive function in Tg2576 mice LA.....	158
3.3. Increased amyloid pathology in AD brains is correlated to decreased VGLUT1 expression.....	158
3.4. Effect of A β on hippocampal plasticity in VGLUT1+/-.....	160
4. Discussion.....	164
Funding and disclosures.....	167
Supplementary data.....	168
References.....	170
Capítulo VI: Discusión general.....	179
Referencias.....	193
Capítulo VII: Conclusiones.....	205
Capítulo VII: Conclusions.....	211

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Alzheimer

1.1. Definición, historia y epidemiología

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común y más frecuente de demencia. La demencia es un síndrome que afecta a la memoria, el pensamiento, el comportamiento y a la habilidad para desarrollar las actividades de la vida diaria. Es una de las principales causas de dependencia y de discapacidad entre la gente mayor.

La EA es una patología neurodegenerativa progresiva e irreversible producida por la pérdida paulatina de neuronas, principalmente en el hipocampo y la corteza cerebral. La enfermedad puede tener una duración variable, pero generalmente se padece como media a lo largo de unos 10 años aproximadamente («World Alzheimer Report 2014: Dementia and Risk Reduction | Alzheimer's Disease International» 2015). Aunque se cree que los cambios subyacentes previos a la aparición de la EA probablemente se desarrollan por un periodo de al menos 20 a 30 años antes del establecimiento de los síntomas. La duración de la enfermedad y la poca eficacia mostrada por los tratamientos disponibles hasta el momento hace necesario el avance en las investigaciones en la EA.

Clínicamente, la EA se caracteriza por un deterioro en las funciones cognitivas del paciente relacionado con el deterioro neuronal progresivo e irreversible. En fases iniciales el paciente presenta trastornos en la memoria de hechos recientes (memoria a corto plazo) y una incapacidad para realizar tareas cotidianas. Estas incapacidades avanzan progresivamente hacia el total deterioro de las funciones mentales, alteraciones de la personalidad, problemas de conducta e incapacidad para valerse por sí mismo. En fases avanzadas, los pacientes están desorientados y desconocen incluso a sus familiares más próximos. En las últimas etapas (fase moderada-avanzada) de la EA, el enfermo no es capaz de valerse por sí mismo y depende totalmente de sus familiares y/o cuidadores, que

deben enfrentarse diariamente a problemas como la desorientación, agitación, agresividad, depresión y otros síntomas como la pérdida de conciencia, descoordinación motora o dificultades en el lenguaje tanto hablado como escrito.

El nombre de esta patología fue acuñada por el Dr. Emil Kraepelin (1856-1926) considerado como uno de los principales psiquiatras alemanes de finales de siglo XIX en honor al Dr. Alois Alzheimer (1864-1915) (Figura 1), médico alemán que trabajó conjuntamente con el Dr. Kraepelin. En 1901, el Dr. Alzheimer atendió en un hospital de Frankfurt a una paciente de 51 años llamada Auguste

Deter (1850-1906) que padecía una nueva enfermedad, caracterizada por gran parte de los síntomas enunciados anteriormente. Los síntomas fueron empeorando gradualmente, hasta tener alucinaciones y pérdida de numerosas funciones mentales. En el examen neuropatológico *post-mortem* del cerebro de esta mujer se detectaron en la corteza cerebral numerosas estructuras anómalas tales como las placas seniles y los ovillos

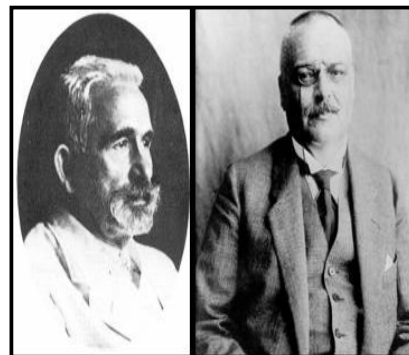


Figura 1. Izda.: Emil Kraepelin (1856-1926). Dcha.: Alois Alzheimer (1864-1915)

neurofibrilares (ONFs), además de una disminución del volumen cerebral total, pero especialmente en la región cortical (Maurer et al. 1997). Este caso fue descrito por primera vez en la historia por el mismo Dr. Alzheimer en una ponencia en 1906 que posteriormente fue publicado en 1907 con el título “Ueber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde” (“Sobre una extraña enfermedad de la corteza cerebral”).

El escenario mundial futuro de la demencia parece devastador con las previsiones que se hacen sobre la enfermedad. Según estimaciones del “World Alzheimer Report 2014”, 135 millones de personas sufrirán demencia en el 2050. Es ampliamente aceptado que existe un aumento exponencial de las cifras de incidencia y prevalencia de la EA según la edad del

paciente, siendo la edad el principal factor de riesgo para la EA. Se han descrito que los casos de EA son el 50-75% de los casos totales de demencia («World Alzheimer Report 2014: Dementia and Risk Reduction | Alzheimer's Disease International» 2015). Por lo que debido al mayor envejecimiento de la población mundial, la EA se ha convertido, a día de hoy, en uno de los grandes problemas sanitarios de la sociedad actual.

La incidencia de la EA aumenta exponencialmente a partir de los 65 años de modo que una de cada nueve personas de edad o mayor de 65 años tiene EA. Del conjunto global de enfermos de EA, los de edad mayor a 75 años suponen el 82%.

Por etnias, una de las últimas estimaciones apunta a que un 0.5% de la población mundial padece EA, de donde Latino América posee la más alta prevalencia (8.5%) y el África sub-Sahariana, la menor (2-4%). En Europa, unos 8 millones de europeos padecen la EA (Prince et al. 2013).

El género también ha sido demostrado como factor diferencial en la prevalencia de la EA, ya que se aprecia un riesgo mayor de padecer la enfermedad en las mujeres (en proporción aproximada de 3 a 1, y particular entre la población mayor de 85 años (Mielke et al. 2014). El hecho de que la esperanza de vida en mujeres es más alta, podría estar sesgando una posible interpretación sobre el efecto protector del género masculino sobre la enfermedad. Sin embargo, otros factores pueden explicar las diferencias de género sobre la enfermedad como diferencias cromosomales y hormonales, de volumen cerebral, o más importantes quizá como pueden ser las diferencias psicosociales y culturales (Vest et al. 2013).

1.2. Patogenia

Macroscópicamente, el cerebro post-mortem de un paciente de EA revela una marcada atrofia cerebral con respecto a cerebros no enfermos y pacientes con deterioro cognitivo leve (Mild cognitive impairment, MCI) que afecta, principalmente, a áreas cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria como el hipocampo, las cortezas temporal, parietal y frontal, y la amígdala (Figura 2). La mayor profundidad de los surcos cerebrales, que corresponde con una reducción en el volumen cerebral, está causada por una importante degeneración neuronal e hipofunción sináptica (Reiner et al. 2012).

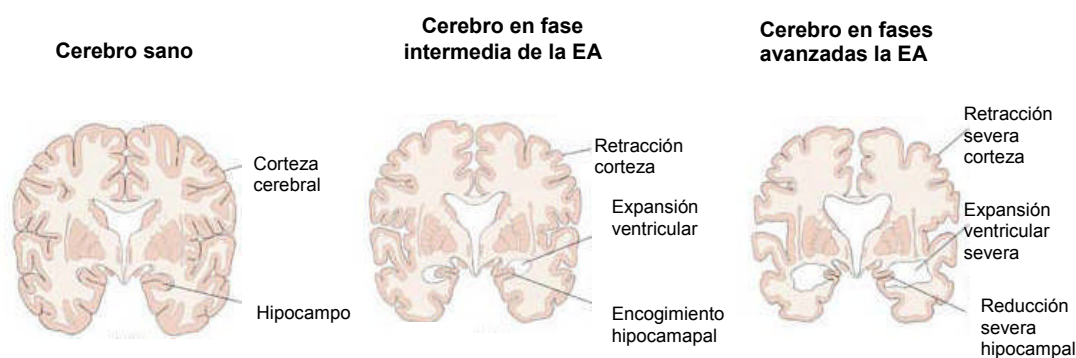


Figura 2. Características macroscópicas de la EA, aumento de los surcos cerebrales debido a atrofia cerebral. Ilustración de Bob Morreale adaptada al castellano (American Health Assistance Foundation www.ahaf.org/alzheimers).

Histopatológicamente, la EA se caracteriza por dos marcadores neuropatológicos que han sido utilizados para el diagnóstico *post-mortem* de la enfermedad (Selkoe, 2004; Hardy, 2006):

Placas seniles: depósitos extracelulares compuestos principalmente por el péptido β -amiloide ($A\beta$) (Figura 3A).

Ovillos neurofibrilares (ONFs): acúmulos filamentosos helicoidales intracelulares de proteína Tau en estado hiperfosforilado (Figura 3B).

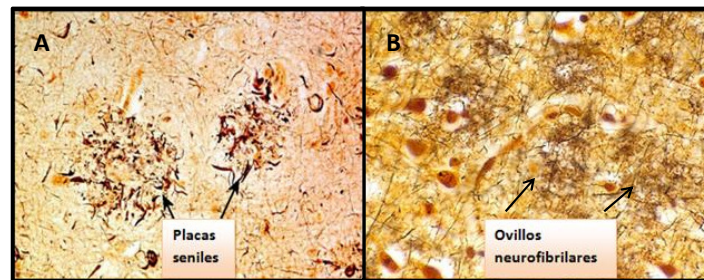


Figura 3. Principales marcadores histopatológicos de la EA. Placas seniles, por acumulación extracelular de péptido amiloide B) Ovillos neurofibrilares, por acumulación intracelular de proteína Tau hiperfosforilada.

En los cerebros de los pacientes con EA hay un patrón bien establecido de aparición de los marcadores histopatológicos. En estadios tempranos de la EA, hay ya presencia de ONFs en regiones límbicas: la porción medial del lóbulo temporal, concretamente en la corteza entorrinal y en la región hipocampal. Esto se correlaciona con un déficit de las funciones de aprendizaje y memoria. La presencia de los ONFs se extiende después a áreas asociativas y estructuras subcorticales a medida que avanza la enfermedad, lo que conlleva un avance del deterioro cognitivo del paciente. Sin embargo, las áreas motoras permanecen libres hasta estadios muy avanzados de la enfermedad (Braak et al. 1995).

En cambio la distribución de las placas seniles es más aleatoria ya que, aunque también se localizan en áreas asociativas, su densidad es relativamente menor en regiones clínicamente relevantes como el hipocampo neuronal (Braak et al. 1995) mientras que pueden ser muy abundantes en regiones clínicamente silentes (Serrano-Pozo et al. 2011).

Además de la presencia de las placas seniles y ONFs, la otra característica principal de la EA es la pérdida significativa neuronal y sináptica en áreas cerebrales vulnerables tales como regiones límbicas y corticales (Scheff et al. 2006). Esta pérdida neuronal y sináptica afecta especialmente a la comunicación interneuronal que se caracteriza histológicamente como una disminución de la densidad de espinas dendríticas (Cavallucci et al. 2012; Ricobaraza et al.

2012). Este proceso favorece la aparición de los síntomas clínicos debido a la desconexión de las neuronas entre las distintas áreas cerebrales.

La posible relación entre la muerte neuronal y los ONFs merece ser comentada. Muchos grupos apuntan que en el hipocampo, la estructura cerebral más afectada en la EA, existe una correlación entre el número de ONFs intracelulares y el número de neuronas dañadas, sugiriendo que una acumulación de Tau hiperfosforilada en el interior de la neurona provocaría un fallo en el funcionamiento celular y posterior muerte neuronal (Braak et al. 1994). La lisis celular sería por tanto la responsable de la liberación de los ovillos hacia el espacio extracelular (Smith et al. 2002). En este sentido, cabe destacar que el número y la distribución de estos ovillos se correlacionan tanto con el grado de pérdida de neuronas y sinapsis como con el deterioro cognitivo en los pacientes (Buée et al. 2010).

1.3. Factores de riesgo para el desarrollo de la EA

Aunque la EA constituye una enfermedad con determinados síntomas y signos patológicos comunes, sólo un pequeño porcentaje de casos de EA se considera de origen familiar o genético (FAD) y la mayor parte se consideran de origen esporádico. Además de la edad, los principales factores de riesgo relacionados con la EA de origen esporádico hasta el momento son los siguientes:

1.3.1. Factores de riesgo genéticos

La presencia de ciertos genotipos contribuye a un aumento de la susceptibilidad a la EA, pero no son suficientes por sí mismos para desarrollar la enfermedad. A la cabeza de este conjunto de factores genéticos aparece principalmente el polimorfismo para la apolipoproteína (ApoE) (Cramer et al. 2012).

En concreto, la variante alélica $\epsilon 4$ (ApoE $\epsilon 4$) es capaz de triplicar el riesgo de padecer la enfermedad en el caso de los heterocigotos y multiplicarlo por 15 en el caso de los homocigotos, respecto a los haplotipos ApoE $\epsilon 2$ y ApoE $\epsilon 3$ (Huang et al. 2006). En los últimos años, el desarrollo de la técnica de estudios de asociación del genoma completo ha permitido confirmar que ApoE $\epsilon 4$ aumenta el riesgo de padecer la enfermedad (Karch et al. 2014), así como ha ayudado a identificar nuevos genes que proporcionan susceptibilidad genética para padecer la EA.

1.3.2. Factores de riesgo vascular

Algunos de los factores de riesgo vascular que se han asociado a un mayor riesgo de desarrollar EA son la hipertensión arterial, la enfermedad cardíaca y la enfermedad cerebrovascular. Existen estudios clínicos que sugieren la posibilidad de que pacientes con hipertensión tratada presenten menos lesiones neuropatológicas de EA que los no tratados (Hoffman et al. 2009). A su vez, los infartos cerebrales múltiples y recurrentes se han asociado a déficit cognitivo y a la aparición de EA (Newman et al. 2005; Loitfelder et al. 2012; de Bruijn et al. 2014).

1.3.3. Inflamación

En los cerebros de sujetos ancianos sanos pueden aparecer algunos signos de inflamación que podrían considerarse fisiológicos debidos al propio envejecimiento cerebral. Sin embargo, en cerebros de EA la neuroinflamación es un claro signo patológico. La inflamación se constata en el cerebro como una fuerte activación de la población celular de la glía, compuesta por oligodendrocitos, astrocitos y células microgliales. Existen evidencias de que diferentes péptidos de naturaleza amiloide pueden

activar tanto los astrocitos como la microglía (Hu et al. 1998). Esta activación mediaría, al menos en parte, la neurotoxicidad provocada por péptidos A β (Garwood et al. 2011).

1.3.4. Factores de riesgo metabólicos

-Hiperlipidemia e hipercolesterolemia: Distintos estudios sugieren que la desregulación de las cascadas del metabolismo lipídico están implicadas en la génesis o desarrollo del EA (Di Paolo et al. 2011). Niveles elevados de colesterol hacia los 50 años de edad son un factor de riesgo de MCI en edades más avanzadas (Kivipelto et al. 2005). Además, algunos estudios sugieren que las alteraciones del metabolismo del colesterol a través del 24S-hidroxi-colesterol o del 27-hidroxi-colesterol están asociados con la neurodegeneración (Popp et al. 2013; Heverin et al. 2015). En cuanto a los ácidos grasos, la ingesta moderada o elevada de grasas mono o poliinsaturadas se ha descrito como factor protector (Florent-Bécharde et al. 2009), mientras que la ingesta moderada de grasas saturadas o *trans* incrementa el riesgo de padecer EA (Morris et al. 2014), sobre todo según la variante alélica ApoE del individuo. Estos ácidos grasos podrían conducir al desarrollo de la enfermedad por diversos mecanismos como la aterosclerosis, el estrés oxidativo o la inflamación.

-Obesidad: Se ha demostrado la relación entre la obesidad y el deterioro cognitivo y demencia (Kiliaan et al. 2014). Un alto índice de masa corporal (IMC) en la edad adulta se relaciona con un incremento en el riesgo de padecer demencia en la vejez (Gustafson, 2006).

-Diabetes e insulino-resistencia: Un gran número de investigaciones ha relacionado la EA con trastornos metabólicos particularmente con la hiperglucemia y la resistencia a la insulina (de la Monte, 2012). Una elevada proporción de afectados por la EA muestran altos niveles plasmáticos de insulina y baja utilización de glucosa central, perfil que es característico de una resistencia a la insulina (Craft et al. 1999a). Este punto va a ser desarrollado en el apartado 2.2.3. de la presente introducción.

1.3.5. Factores de riesgo ambientales

-Estrés: El estrés, considerado como la epidemia del siglo XXI en países de primer mundo, puede presentarse en épocas prenatales, neonatales o en edad adulta. Cada vez más estudios demuestran un posible rol crucial del estrés crónico en el desarrollo de enfermedades neuropsiquiátricas como depresión y ansiedad. Éstas a su vez han sido consideradas factores de riesgo para padecer EA. De hecho, el hipocampo, región cerebral muy afectada en la EA, es la estructura cerebral que más se ha relacionado con los efectos nocivos del estrés (Sapolsky, 2000; Bremner et al. 2000; Conrad et al. 2008; Stratmann et al. 2014). Por un lado, la disminución de la neurogénesis aparece como una alteración común en patologías asociadas al estrés, sobre todo en la zona subgranular del hipocampo, donde se ha descrito haber neurogénesis (Snyder et al. 2011). La muerte neuronal por distintos mecanismos de las áreas responsables de neurogénesis desencadena la atrofia hipocampal y el deterioro cognitivo, entre otros (Chadwick et al. 2011). Es más, ha sido descrito que una situación de estrés crónico causa deterioro cognitivo (Solas et al. 2010; Cuadrado-Tejedor et al. 2012) y un aumento en la patología sináptica y amiloide, una situación muy similar a lo que ocurre en la EA.

1.4. Etiología

Entre un 1 y un 5% de los casos, se considera EA de origen genético (“Enfermedad de Alzheimer familiar” o FAD por sus siglas en inglés), en el que la enfermedad generalmente se presenta a edades más tempranas. En estos casos la causa de la enfermedad es la presencia de ciertas mutaciones genéticas (mutaciones en los genes de la proteína precursora del amiloide (APP), presenilina 1 y/o presenilina 2), que resultan ser suficientes para provocar las manifestaciones clínicas y patológicas de la enfermedad. Sin embargo, en un

porcentaje muy elevado de los casos (95- 99%) se desconocen la o las causas que producen la EA. Estos casos se denominan “EA esporádica o tardía”. La aparición de los síntomas se produce a edades avanzadas, a partir de los 65 años. La etiología de la EA esporádica es difusa y compleja y se han descrito múltiples factores de riesgo y/o protectores, de carácter genético o ambiental, que afectan a la vulnerabilidad para padecer la enfermedad, como se ha visto en el punto 1.3 de la presente introducción.

En conjunto se puede afirmar que aunque varias teorías intentan dar explicación al desarrollo de la enfermedad, las causas de la EA siguen sin estar esclarecidas. Por un lado, una de las principales teorías es la “hipótesis de la cascada del amiloide”, que postula que el desencadenante inicial que finalmente lleva a la neurodegeneración y a la demencia es el desequilibrio entre la producción y el aclaramiento del péptido A β (Hardy et al. 2002; Glenner et al. 2012). Por otro lado, existe la teoría de que la hiperfosforilación de Tau y la degeneración neurofibrilar son las responsables de los trastornos cognitivos que se producen en la EA (Iqbal et al. 2005; Medeiros et al. 2011). La patología sináptica también ha sido implicada en la génesis de la EA. En cualquier caso, las principales características patológicas de la EA (patología amiloide, patología Tau y patología sináptica) han dado lugar a diferentes teorías que intentan dar explicación de cuáles son las causas y consecuencias de la EA. Sin embargo, no se ha confirmado la validez de ninguna de ellas.

Hipótesis de la cascada amiloide

Los péptidos A β son producidos por el corte de la APP. La APP es una proteína transmembrana ubicua a nivel celular cuya función no está bien establecida, aunque se cree que juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura axonal. Posee una porción intracelular pequeña que contiene el extremo carboxilo terminal (c-terminal), una

región transmembrana y una porción extracelular relativamente larga (Figueiredo-Pereira et al. 1999).

El procesamiento proteolítico de la APP puede seguir dos vías metabólicas opuestas (Figura 4):

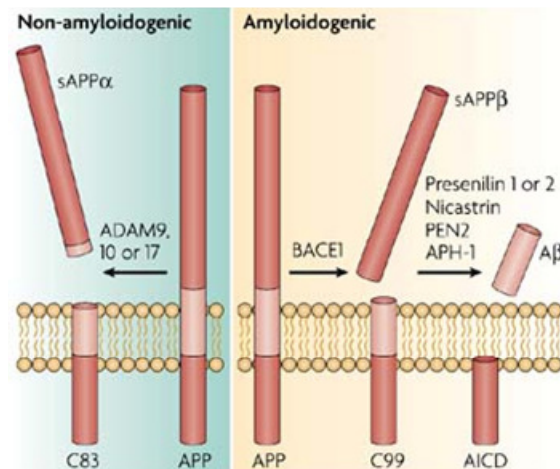


Figura 4. Procesamiento de la APP. Procesamiento no amiloidogénico: la enzima α -secretasa, miembro de la familia de metaloproteasas (ADAM), corta la zona intermedia del péptido A β , formando una proteína que es excretada al medio extracelular (sAPP α), y un péptido de 83 aminoácidos (C83 o α -CTF). Procesamiento amiloidogénico: La β -secretasa (BACE1) corta por el extremo amino terminal de la región del péptido A β , generando un fragmento (sAPP β), y un péptido de 99 aminoácidos (C99 o β CTF). Este fragmento sufre un nuevo corte por la γ -secretasa (formada por presenilinas o nicastrinas, entre otras), generándose el AICD y el péptido A β (Adaptado de LaFerla et al. 2007).

-Procesamiento no amiloidogénico: Es el procesamiento que mayoritariamente se da en condiciones fisiológicas, donde la enzima α -secretasa corta la porción intermedia correspondiente a la región del péptido A β , concretamente en la Lys16, dando origen a una proteína larga que se compone de prácticamente toda la región extracelular de la APP y que es excretada al medio extracelular nada más ser cortada (α APPs), y un péptido de 83 aminoácidos denominado C83 (α -CTF) (Yamazaki et al. 1996). Este último es procesado posteriormente por acción de la γ -secretasa produciendo un péptido conocido como p3 y

el fragmento C-terminal de la proteína precursora del amiloide (AICD, amyloid precursor protein intracellular domain) (Lammich et al. 1999). Se ha descrito que tanto el fragmento α APPs como el C83 poseen efectos beneficiosos en cultivos neuronales que se asocian a la supervivencia celular, interacción célula-matriz intersticial, crecimiento de neuritas, potenciación sináptica y plasticidad neuronal (Shivers et al. 1988; Jin et al. 1994; Perez et al. 1997; Meziane et al. 1998; Nhan et al. 2015).

-Procesamiento amiloidogénico: En el metabolismo amiloidogénico, la β -secretasa (BACE1) proteoliza el extremo amino terminal de la región del péptido $A\beta$, generando dos fragmentos: uno distal que se segrega al medio extracelular, conocido como β APPs, y un péptido de 99 aminoácidos unido a la membrana denominado C99 (o β -CTF), que contiene todo el péptido $A\beta$ y el extremo carboxilo de la APP. Este fragmento es internalizado hasta llegar a los lisosomas donde sufre una nueva digestión proteolítica por la γ -secretasa (formada por presenilinas 1 o 2, entre otras), generándose un péptido de 55-57 aminoácidos (AICD) y el péptido $A\beta$, que puede variar entre 38 y 43 aminoácidos. La especie mayoritaria humana de $A\beta$ es aquella que contiene 40 aminoácidos ($A\beta_{1-40}$) pero, aunque de manera minoritaria (10-15%), la γ -secretasa produce también péptidos de 42 aminoácidos ($A\beta_{1-42}$).

Se ha descrito que la relación entre $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-40}$ puede ser importante en la etiología de la enfermedad (Wiltfang et al. 2007), ya que la neurotoxicidad inducida por $A\beta_{1-42}$ es mayor que $A\beta_{1-40}$. En las placas de β -amiloide y líquido cefalorraquídeo (LCF) se ha detectado además, la presencia de $A\beta_{1-38}$ (Moro et al. 2012) o $A\beta_{1-43}$ (Welander et al. 2009), más péptidos derivados del procesamiento amiloidogénico de la APP, cuya patogenicidad parece ser también importante en la EA (Sandebning et al. 2013). Aunque hay una gran controversia en torno a la importancia de los fragmentos derivados de la APP en la patología,

sí hay consenso en que el procesamiento amiloidogénico constituye el origen de una serie de alteraciones moleculares desencadenan los eventos patológicos como la neurotoxicidad, formación de ONFs, estrés oxidativo, inflamación y, finalmente, neurodegeneración (Selkoe et al. 1997; Wirths et al. 2004) (Figura 5).

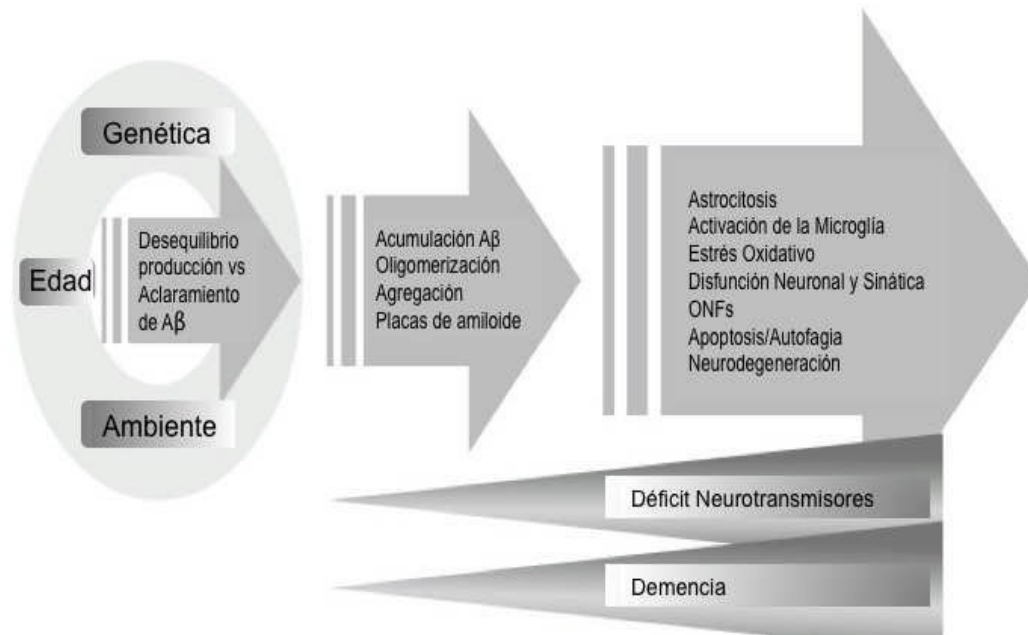


Figura 5. Hipótesis de la cascada del péptido β -amiloide. Esta teoría presenta la patología amiloide como principal desencadenante patológico de la EA. Son la acumulación, oligomerización y formación de placas de amiloide los que preceden a los eventos neuropatológicos descritos, que además vienen acompañados del déficit de neurotransmisores y de la demencia y deterioro cognitivo en los pacientes. (Adaptado de Wirths et al. 2004).

Durante mucho tiempo se creyó que sólo el $A\beta$ depositado en placas, y no en forma de oligómeros o fibras, era neurotóxico, sin embargo, actualmente existen numerosos estudios que defienden el papel neurotóxico de fibras y oligómeros solubles (Zempel et al. 2010; Benilova et al. 2012; Eisenberg y Jucker 2012; Stroud et al. 2012) y su alteración sobre la función sináptica (Walsh et al. 2002; Cleary et al. 2005). Se observó que el tratamiento con formas oligoméricas de $A\beta$ en líneas celulares y en cultivos primarios conducía a la muerte celular, con lo que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ podrían resultar mucho más tóxicos que los

monómeros o el A β ₁₋₄₂ fibrilar (Dahlgren et al. 2002). Por tanto, es cada vez más aceptado que son los oligómeros (dímeros, trímeros, dodecámeros...) y fibras de A β las responsables de la disfunción neuronal y del deterioro cognitivo que se producen en la EA.

Por otro lado, la acumulación de A β detectada en la EA no es únicamente extracelular, sino que una parte queda atrapado en la neurona (Oddo et al. 2003; Echeverria et al. 2004; Wirths et al. 2004). Esto ocurre porque la APP se localiza en diversos compartimentos celulares, como en la membrana plasmática, en el aparato de Golgi, en el retículo endoplasmático, o en las membranas de endosomas, lisosomas y mitocondrias (Figura 6).

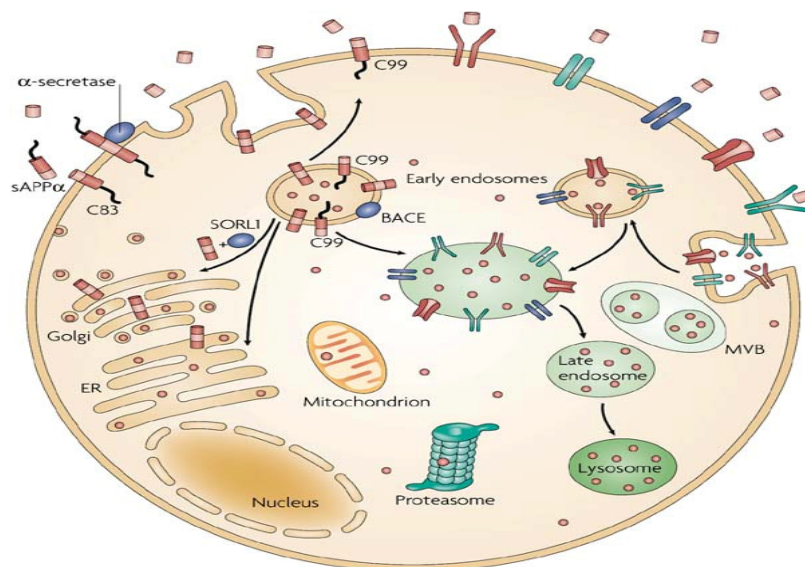


Figura 6. Lugares de producción de A β . El APP se produce dentro del retículo endoplásmico (RE) y del aparato de Golgi. Una vez producido se dirige a la membrana celular, donde sufrirá el procesamiento amiloidogénico o no amiloidogénico. El APP no procesado se internaliza mediante endosomas. Estos endosomas contienen el enzima BACE1, que cortará el APP para dar el fragmento C99. Este fragmento se transportará hasta el RE o la membrana celular, donde será procesado por la γ -secretasa para dar el A β , de manera que, tras ser producido, éste péptido podrá acumularse dentro de la célula en mitocondrias, RE, Golgi o en el citosol. (Adaptado de (LaFerla et al. 2007).

El APP se puede procesar en cualquiera de esas localizaciones, liberándose el péptido A β directamente al espacio extracelular o al intracelular, donde se ha observado que se acumula más tempranamente que en el espacio extracelular (Billings et al. 2007). Además, la existencia de A β intracelular parece ser más relevante del que en un principio se pensaba (Gouras et al. 2005; LaFerla et al. 2007), ya que la acumulación intraneuronal es el factor de la patología amiloidogénica que mejor correlaciona con la neurodegeneración en la EA y con la aparición y severidad del déficit cognitivo que sufren diferentes modelos animales (Cruz et al. 2006; Knobloch et al. 2007).

Inicialmente se pensó que el A β se producía sólo en pacientes de EA, sin embargo, más tarde se comprobó que se produce constitutivamente durante el metabolismo fisiológico celular no patológico (Haass et al. 1992). Por ello, en el caso de la EA de tipo esporádico se plantea que la acumulación de A β se debe al déficit en la capacidad de aclaramiento del mismo (Hama et al. 2005) y no a un aumento en su producción. En este punto es, según esta hipótesis, donde jugarían un papel relevante otros factores. De hecho, diversos estudios han puesto de manifiesto que en cerebros de pacientes afectados de EA se produce una alteración significativa de los mecanismos encargados del aclaramiento de proteínas anómalas tales como el péptido A β y la proteína Tau (Hardy et al. 2002). Los mecanismos fisiológicos implicados en la eliminación del péptido A β son diversos pero entre ellos se encuentran las endopeptidasas tales como la enzima degradadora de insulina (IDE, por sus siglas en inglés) (Behl et al. 2009) o la neprilisina entre otras (Hemming et al. 2007).

Hipótesis de Tau

La proteína Tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (microtubule-associated proteins, MAPs) que se expresa en los axones neuronales.

Aunque también se puede expresar en menor proporción en astrocitos y oligodendrocitos. Está localizada en el citosol neuronal donde se une a la tubulina, entre otras proteínas, para la estabilización del citoesqueleto en los axones neuronales. Este hecho le confiere un papel fundamental en la formación y mantenimiento de ramificaciones neuronales, concretamente en los axones.

La proteína Tau puede ser fosforilada en unos 79 residuos de serina/treonina (Goedert et al. 1989). En la EA, al menos 30 de estos residuos se encuentran fosforilados (Gong et al. 2005) por dos tipos diferentes de cinasas: las dirigidas a serina como la cinasa 3 de la glicógeno sintasa (GSK3 β), la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), p38 y la cinasa N-terminal de la c-Jun (JNK), así como las dirigidas a tirosina, como la cinasa reguladora de la afinidad a microtúbulos (MARK), la cinasa II dependiente de Ca²⁺/calmodulina tipo 2 (CaMKII) y la cinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico tipo A y C (PKA y PKC, respectivamente) (Avila, 2006; Martin et al. 2013).

El grado de fosforilación determina su actividad. En un estado de hiperfosforilación no cumple su función fisiológica, provocando un colapso del sistema de transporte que conduce a una disfunción sináptica y a la muerte neuronal. Esta observación apoya la hipótesis “Tauísta”, la cual postula que esta proteína es la que desencadena toda la batería de efectos moleculares, que luego confluyen en deterioro cognitivo severo y pérdida de memoria (Mudher et al. 2002). En este estado de hiperfosforilación, Tau aumenta su tendencia a agregarse en forma de filamentos helicoidales pareados (paired helical filaments, PHF) (Morishima-Kawashima et al. 1995) que posteriormente acabarían dando lugar a los ONFs (Goedert et al. 1991). Esto conduce a la desintegración de los microtúbulos del citoesqueleto celular colapsando el sistema de transporte axonal de la neurona (Figura 7). En estas condiciones, puede darse inicio a las primeras disfunciones sinápticas y conducir finalmente a la muerte neuronal (Chun et al. 2007; Tenreiro et al. 2014).

La hipótesis “Tauísta” sugiere que es principalmente esta proteína la que desencadena el deterioro de estructuras y de las funciones neuronales (Mudher et al. 2002). Aunque se ha observado que cantidades elevadas de A β aumentan la formación de lesiones por Tau fibrilar en modelos animales de EA (Lewis et al. 2001). Lo que significaría que A β induciría la hiperfosforilación de Tau, pero sería esta última la que promovería el desarrollo de cascadas neurodegenerativas. No obstante, el nexo entre A β y la patología Tau sigue aún sin esclarecerse de manera definitiva.

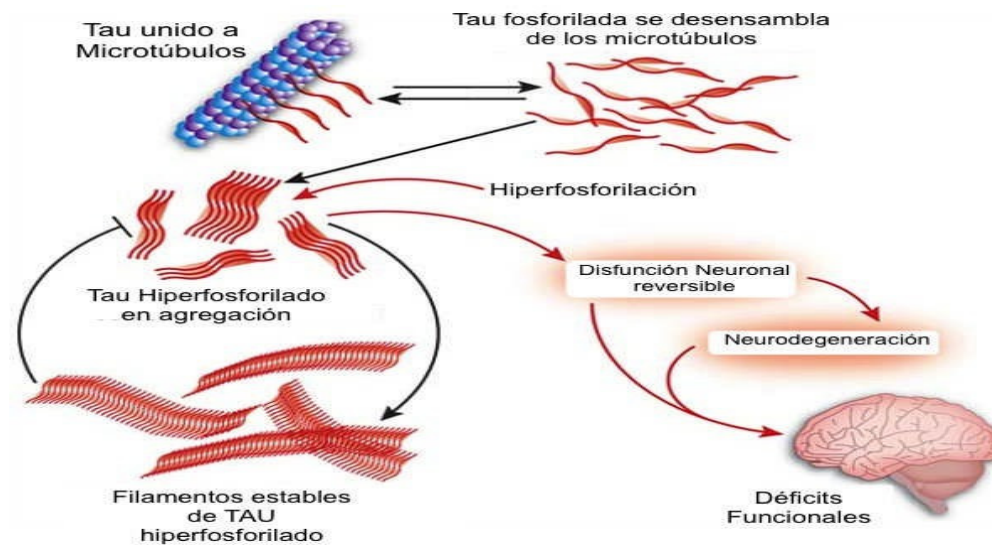


Figura 7. Alteración de los microtúbulos derivada de la fosforilación de la proteína Tau. Cuando Tau se hiperfosforila se desensambla de los microtúbulos, que se desintegrarán, provocando el colapso el sistema de transporte de la neurona. La hiperfosforilación aumenta su tendencia a agregarse en forma de filamentos helicoidales pareados, que son capaces de enlazarse helicoidalmente formando los ONFs (Adaptado de (Noble et al. 2005)).

1.5. Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer

Mientras que el diagnóstico clínico de la EA se realiza con bastante certeza y se confirma *postmortem*, el tratamiento de la enfermedad dista mucho de ser curativo. El principal objetivo de las terapias contra la EA (combinación de tratamientos farmacológicos

y no farmacológicos) es frenar el deterioro de las funciones afectadas y preservar las funciones cognitivas existentes.

Además de los utilizados para el tratamiento de las alteraciones conductuales como antidepresivos, antipsicóticos o ansiolíticos, los fármacos aprobados que en la actualidad se emplean para el tratamiento sintomático de la EA son:

Inhibidores de la acetilcolinesterasa

En estadios tempranos de la EA se ha descrito un intenso déficit colinérgico, con una degeneración de las neuronas colinérgicas que causa una disminución de acetilcolina en las terminales presinápticas de hipocampo y neocortex, lo que produciría alteraciones en la memoria (Terry et al. 2003). Actualmente se encuentran comercializados en España 3 de estos inhibidores reversibles o pseudoreversibles: galantamina, donepezilo y rivastigmina. Éstos aumentan la disponibilidad de acetilcolina en la hendidura sináptica al inhibir la enzima encargada de su degradación, lo que produce un aumento de la función colinérgica de los pacientes de EA.

Memantina

Es un antagonista débil y no competitivo del receptor de NMDA. En condiciones normales, el glutamato y el receptor NMDA juegan un papel importante en procesos de aprendizaje y memoria. Sin embargo, bajo condiciones patológicas, como en el caso de la EA, el aumento de la actividad glutamatérgica produce un exceso de la activación de los receptores de NMDA, lo que lleva a una disfunción neuronal.

2. Metabolismo, obtención de energía y EA

2.1. Sustratos energéticos cerebrales

El cerebro humano aunque tan sólo representa sobre el 2% del peso total del cuerpo, requiere una energía para su mantenimiento de hasta el 20% de la tasa metabólica en reposo de un individuo (Attwell et al. 2001) o de hasta el 50% de la utilización de la glucosa corporal (Fehm et al. 2006). Aproximadamente el 75% de la energía consumida por el cerebro es utilizada en procesos de señalización mientras que el 25% restante se utiliza para actividades básicas celulares como la síntesis y degradación de proteínas, distribución de membrana, “turnover” de proteínas y de fosfolípidos, entre otros (Attwell et al. 2001).

La situación particular del cerebro respecto al resto de los órganos del cuerpo, se caracteriza por su aislamiento químico del resto del cuerpo por la barrera hemato encefálica (BHE), su alto consumo de energía, su baja capacidad de almacenamiento, la selectividad de los sustratos energéticos, su plasticidad para readaptarse a nuevas circunstancias y su habilidad para recoger información de los órganos periféricos y adaptarla a sus propias necesidades (Peters et al. 2004).

En los mamíferos la glucosa es el principal sustrato para la producción de energía (ATP) en las neuronas. La glucosa es inequívocamente el combustible energético y el único sustrato disponible para sustentar la actividad neuronal (Siesjo, 1978) por lo que cualquier perturbación en el metabolismo glucídico podría comprometer la cognición (Ver revisión de Smith et al. 2011). La producción de energía a partir de hidratos de carbono, con la glucosa como principal sustrato, se consigue por 3 vías: glucólisis, ciclo de ácidos tricarbóxicos (TCA) o ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa (cadena de transporte de electrones). Es por vía oxidativa donde se consume la mayor parte de la glucosa empleada, tanto en condiciones basales como en estados activados (Sokoloff et al. 1977).

2.2. Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos, producida y segregada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. El principal estímulo que desencadena la secreción de insulina es la glucosa; sin embargo, otros nutrientes, como aminoácidos, ácidos grasos y cuerpos cetónicos, también contribuyen a su liberación, sin olvidar la modulación producida por hormonas gastrointestinales y pancreáticas, así como neurotransmisores adrenérgicos, colinérgicos o excitatorios, como recientemente se ha propuesto para el glutamato y sus transportadores (Gammelsaeter et al. 2011).

La insulina desempeña un papel fundamental en el control del metabolismo. Es una hormona anabolizante que favorece la captación, utilización y almacenamiento de glucosa, aminoácidos y lípidos después de la ingesta, al tiempo que ejerce una acción inhibitoria sobre procesos catabólicos, como la degradación de glucógeno, grasas y proteínas.

La insulina ejerce su acción uniéndose a su receptor específico, denominado receptor de insulina o receptor insulínico (IR). Este receptor está presente en prácticamente todos los tejidos de mamíferos, incluso en cerebro.

Los IR pertenecen a la clase de receptores tirosina cinasa, de modo que cuando se une la insulina, se produce la autofosforilación del dominio intracelular y se inicia la actividad tirosina cinasa del receptor. Tras esta autofosforilación, el receptor fosforila a su vez a un número de sustratos intracelulares con residuos específicos de tirosina y de este modo, se inicia la señalización intracelular. Esta familia de sustratos la componen los IRS (insulin receptor substrate), de entre los cuales principalmente se conocen y cabe señalar por su importancia y abundante expresión en el cerebro, el IRS1, IRS2 e IRS4. La ablación genética, en animales de los diferentes IRS da lugar a alteraciones del crecimiento y a una modificación variable del metabolismo de la glucosa (Massó et al. 2014). En este punto, el

receptor de insulina puede seguir dos grandes vías de señalización: la vía de la PI3K (fosfoinositol-3-cinasa) y la vía de los activadores de mitógenos (las Ras-MAP cinasas [MAPK]) (Zhao et al. 2001; Nelson et al. 2008) (Figura 8). Estas dos vías no pueden concebirse como algo absolutamente independiente, puesto que en determinadas circunstancias una puede activar la otra. Además, se cree que ambas vías están fuertemente involucradas en la acción de la insulina sobre el aprendizaje y la memoria.

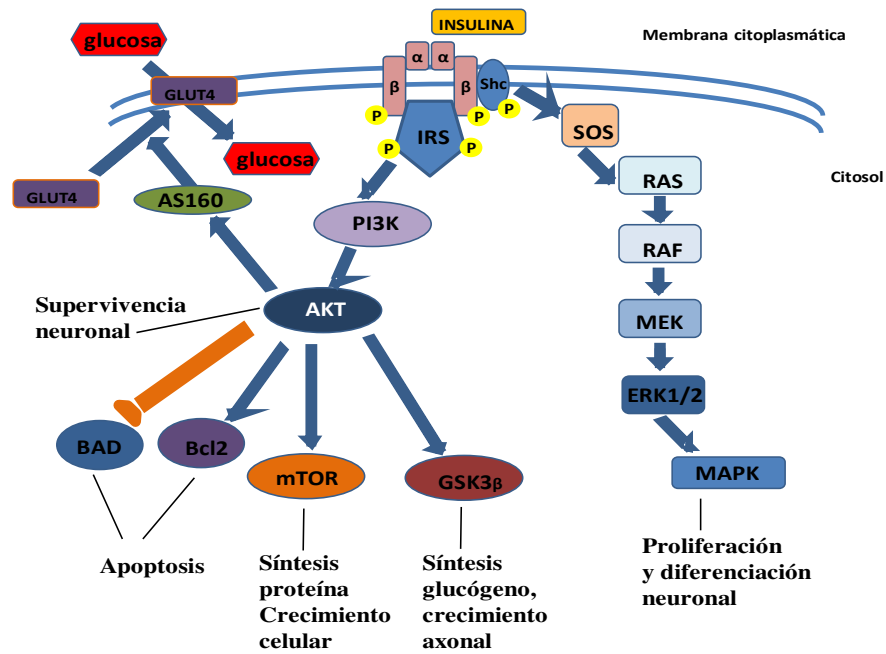


Figura 8. Cascada señalización insulina y sus efectos. La unión de la insulina a su receptor recluta proteínas Shc y sustratos de receptor de insulina (IRS). La fosforilación de IRS activa PI3K y ésta, tras una cascada compleja, activará fosforilando a AKT, con su implicación en distintos procesos mediante la activación de proteínas como mTOR, GSK3β, Bcl2 o mediante la inhibición de BAD. Alternativamente, fosforilación de Shc activa la vía MAPK, implicada en proliferación celular. A su vez, un sustrato de AKT (AS160) es fosforilado para permitir la traslocación de glucosa a través de transportadores sensibles a insulina (GLUT4). (Adaptado de Zhao et al. 2001)

2.2.1. Insulina y cerebro

Hasta el año 2000 aproximadamente, el cerebro había sido descrito como “un órgano insensible al efecto de la insulina”, sabiendo que la glucosa podía ser metabolizada por las

neuronas sin la implicación de insulina ni de IR. Pero a día de hoy se sabe que el cerebro es una diana de la insulina y que la señalización de la insulina en neuronas tiene un impacto crucial en la formación y el desarrollo de circuitos neuronales, incluso ya desde etapas tempranas del cerebro (Chiu et al. 2008).

A finales de 1970, la presencia de insulina cerebral en rata fue encontrada por primera vez por Havrankova et al. (1978b) y describieron la existencia dos localizaciones independientes de insulina: uno cerebral y otro periférico (Havrankova et al. 1979). Aunque a día de hoy, aún sigue la controversia en cuanto si la insulina es sintetizada en el cerebro adulto. Hay evidencias que parecen demostrar el origen cerebral de la insulina, como por ejemplo, la existencia de péptido C (cadena de aminoácidos que forma parte de la proinsulina: precursora de insulina) en cerebros humanos (sobre todo en hipotálamo) (Dorn et al. 1983; Jezová et al. 1985; Frölich et al. 1998).

En cerebro de fetos de ratas, de ratas recién nacidas y de conejos recién nacidos se ha detectado la existencia de mRNA de insulina (Devaskar et al. 1993; Devaskar et al. 1994). Incluso a través de aproximaciones experimentales por ablación o cultivos de células neuronales se ha detectado la síntesis de insulina (Schechter et al. 1994; Rulifson et al. 2002), implicando mecanismos moleculares similares en la producción y secreción de insulina entre las células β pancreáticas y las neuronas (Santos et al. 1999; Gerozissis et al. 2003).

Existen dos vías (no excluyentes) por las que la insulina puede estar presente en el cerebro: pasando desde el plasma al fluido intersticial cerebral atravesando la BHE por un transporte saturable mediado por IR (Baura et al. 1993; Banks et al. 1997) (Figura 9) o sintetizándose directamente en el cerebro, cómo hemos indicado anteriormente.

El IR cerebral tienen similares propiedades cinéticas y farmacológicas que los descritos en los tejidos periféricos (Zahniser et al. 1984), aunque parece que los IR cerebrales son de

menor tamaño y de menor grado de glicosilación. Incluso se ha sugerido que mientras los IR periféricos responden al exceso de insulina con una disminución en su expresión, los IR cerebrales no lo hacen tan fácilmente (Heidenreich et al. 1983). Dentro de los IR en el cerebro adulto de mamíferos se distinguen dos subtipos: IR glial y otro específico de neuronas, con similar transducción de la señal de insulina (Wozniak et al. 1993; Abbott et al. 1999).

El IR cerebral se localiza principalmente en bulbo olfatorio, cerebelo, corteza, hipotálamo, amígdala, septum e hipocampo (Havrankova et al. 1978a; Baskin et al. 1987; Unger et al. 1989; Unger et al. 1991), donde podría ser capaz de facilitar la función cognitiva (Park, 2001). Aunque en menor medida, también se encuentra en la sustancia negra y ganglios basales (Unger et al. 1991).

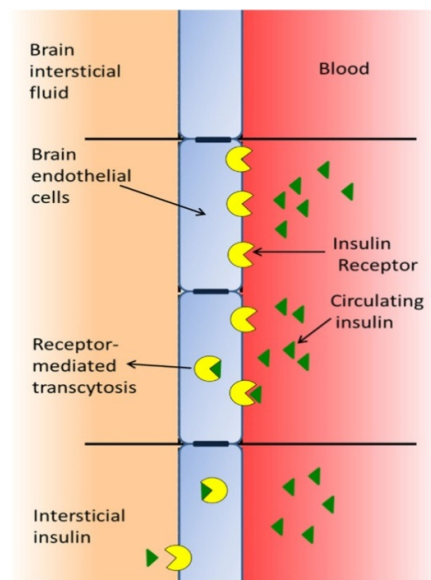


Figura 9. La insulina periférica puede atravesar la barrera hematoencefálica por transcitosis usando un sistema transportador mediado por receptor de insulina (Blázquez et al. 2014)

2.2.2. Insulina y cognición

La evidencia apoya que en el sistema nervioso central (SNC) la insulina posee acciones neurotróficas y neuromoduladoras, ejerciendo una importante función en el establecimiento

de procesos plásticos tales como la memoria. Por lo tanto, la patogénesis de algunas enfermedades neurológicas como los déficits cognitivos asociados a las mismas podrían estar relacionados con alteraciones en los niveles de insulina y/o la sensibilidad a la misma.

La insulina promueve la actividad en neuronas hipocampales piramidales, la utilización de glucosa en la corteza entorrinal e hipocampo, promoviendo el crecimiento neuronal y aumentando la potenciación a largo plazo (LTP) a través de aumento en la actividad de receptores NMDA (fosforilación de subunidades GluN2A y GluN2B). Además se ha demostrado que la inducción de LTP en el giro dentado de rata es inhibido por wortmannina (inhibidor de PI3K) (Kelly et al. 2000), confirmando el papel de la vía de la insulina en este efecto.

Incluso, la insulina puede inducir cambios en la transmisión sináptica esencial para formar la base de la memoria y el aprendizaje (Huang et al. 2004; Van der Heide et al. 2005). Estimulación con insulina sobre rodajas de hipocampo de rata aumenta la expresión de PSD95, proteína involucrada en la estabilización de sinapsis, en el área CA1 del hipocampo de un modo PI3K dependiente (Lee et al. 2005).

En cuanto a la administración intranasal crónica de insulina, se ha observado que mejora el rendimiento cognitivo en individuos no dementes y con EA (sin alterar los niveles de glucosa o insulina plasmática) (Benedict et al. 2007; Hallschmid et al. 2008; Reger et al. 2008; Sabayan et al. 2008; Benedict et al. 2011), y ha sido demostrado que la administración aguda de insulina mejora la memoria declarativa en pacientes con EA (Craft et al. 1996). Además la administración de antidiabéticos sensibilizadores de la insulina, como la rosiglitazona, mejora el declive cognitivo en pacientes con EA (Watson et al. 2005). Estos datos apoyan la hipótesis que la activación de la cascada de señalización de insulina mejora el rendimiento cognitivo.

A pesar de los efectos facilitadores de memoria de la administración de insulina, la hiperinsulinemia o aumento de los niveles de insulina en sangre podría producir efectos opuestos sobre la memoria. En situaciones patológicas de cronicidad de esta hiperinsulinemia, de la resistencia a la insulina o de la disminución en la efectividad de la insulina pueden producir efectos adversos sobre la memoria. Así, la hiperinsulinemia periférica prolongada disminuye los receptores de insulina a nivel de la BHE, reduciendo de este modo el transporte de insulina hacia el cerebro (Wallum et al. 1987; Schwartz et al. 1990; Freiherr et al. 2013) considerándose la hiperinsulinemia a largo plazo un factor de riesgo para la demencia (Ott et al. 1999; Biessels et al. 2006).

2.2.3. Resistencia a la insulina y diabetes mellitus

A nivel periférico, la existencia de un defecto en la secreción y/o en la acción de la insulina es responsable de la aparición de diabetes mellitus (DM), una enfermedad muy frecuente caracterizada por hiperglucemia secundaria crónica. Principalmente la DM es un trastorno del metabolismo hidrocarbonado, aunque no podemos olvidar que el proceso también afecta al metabolismo proteico y lipídico. En su fisiopatología subyace un déficit de células β y/o una insulino-resistencia, que puede estar condicionado tanto por componentes genéticos como por diversas circunstancias particulares de cada paciente (autoinmunidad, obesidad, gestación, infecciones, tóxicos, etc.).

La DM, incluso con tratamiento, es una enfermedad progresiva que puede acelerarse (o agravarse) en función del grado de control que se consiga de la hiperglucemia, así como de la coexistencia de otros factores, como pueden ser la hipertensión arterial o la dislipemia.

En la DM se debe tener presente que la duración de la hiperglucemia y su gravedad son los factores más importantes en la aparición a medio y largo plazo de complicaciones de muy

diversa índole. Así, la falta de acción insulínica, sea de la etiología que sea, inducirá una mala utilización de la glucosa que dará lugar, sobre todo, a la triada clásica de poliuria, polidipsia y polifagia, pero, junto a estos síntomas, existirá un espectro clínico muy amplio que puede ir desde manifestaciones puramente catabólicas como la pérdida de peso, a otras que son la consecuencia de la afectación progresiva de los diferentes órganos y aparatos: pérdida de visión (o ceguera), afectación renal (que puede derivar en insuficiencia renal, a hemodiálisis o trasplante renal), insuficiencia arterial de extremidades inferiores (posibles amputaciones), cardiopatía isquémica con infarto de miocardio o incremento de la enfermedad vascular cerebral. Sin embargo, el grupo de complicaciones más prevalentes son las relacionadas con el sistema nervioso, tanto en el sistema nervioso periférico como en el autonómico e incluso en el central, la llamada neuropatía diabética (Massó y Jiménez 2014).

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1997 y 1999, respectivamente, propusieron una nueva clasificación de la DM: la DM de tipo 1 (que representa el 5-8% de los casos) donde hay una destrucción de las células β pancreáticas y conduce a la deficiencia absoluta de insulina y la DM 2, con ausencia de destrucción de células β pancreáticas y agrupa los casos con mayor prevalencia (90-95 %).

Patogénicamente, la DM 2 se caracteriza por la presencia de resistencia a la acción periférica de la insulina, secreción de insulina defectuosa o ambas. En el momento del diagnóstico suele haber una mezcla de ambas alteraciones y, etiológicamente, lo característico es la multifactorialidad con ausencia de destrucción autoinmune de las células β .

El concepto de resistencia a la insulina se refiere un estado clínico en el que niveles normales o altos de insulina producen una respuesta biológica atenuada (Cefalu, 2001). Es decir, una disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus efectos biológicos en los tejidos diana. Implica la reducción de la capacidad de la insulina para estimular la utilización de la glucosa por los tejidos, así como la reducción de la supresión de la lipólisis

induciendo la elevación de las concentraciones circulantes de ácidos grasos libres. Al responder menos a la insulina, aumenta la producción de glucosa endógena hepática y disminuye la síntesis de glucógeno hepático.

Los mecanismos que desencadenan la insulino-resistencia no son del todo conocidos. Pueden darse a nivel prerreceptor, receptor o, más frecuentemente, a nivel postreceptor.

A nivel postreceptor, el bloqueo de la activación de la cascada se puede producir a varios niveles en la señalización de insulina. Sustancias liberadas desde el tejido adiposo como ácidos grasos, glicerol, hormonas (leptina, adiponectina, endotelina-1..) o citocinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucinas: IL-1 β , IL-6) (Shoelson et al. 2006) inhiben la actividad de IRS mediante la fosforilación de un residuo específico de serina y treonina (principalmente en IRS1) o en otras proteínas de la cascada intracelular (Boura-Halfon et al. 2009).

2.3. Cuerpos cetónicos

En situaciones de incapacidad para obtener energía a partir de la glucosa, tales como el ayuno, el ejercicio físico de intensidad media-alta durante tiempo prolongado, DM o la resistencia a la insulina, se producen adaptaciones metabólicas que dan lugar a la producción de cuerpos cetónicos que se da principalmente en las mitocondrias de los hepatocitos a partir de los ácidos grasos (Figura 10). Estos cuerpos cetónicos, cuyos representantes principales son el acetoacetato y el 3-D- β -hidroxibutirato, serán por lo tanto, el sustrato alternativo a la glucosa para la obtención de energía en dichas situaciones en las que disminuye la disponibilidad de glucosa.

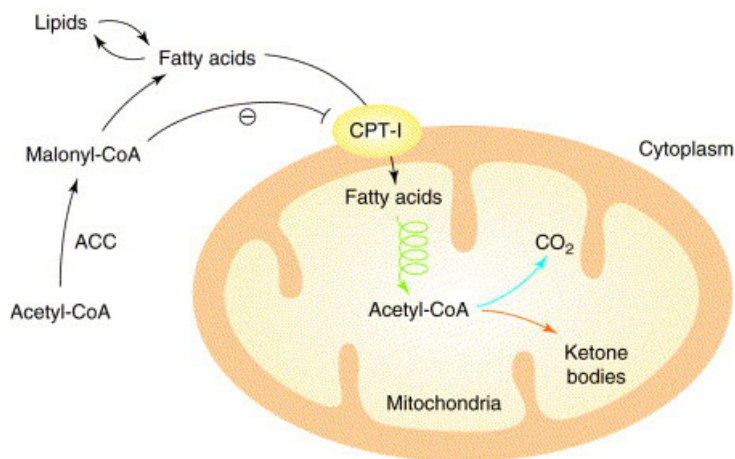


Figura 10. Oxidación de ácidos grasos y cetogénesis. Los ácidos grasos sufren β -oxidación (flecha verde helicoidal), previa translocación hacia la matriz mitocondrial. Una vez dentro de la mitocondria, el acetyl-CoA producido por oxidación puede condensarse para generar cuerpos cetónicos (flecha naranja) o alternativamente la acetyl-CoA podría ser oxidada a CO_2 por acción del ciclo de Krebs (flecha azul). (Figura adaptada de Guzmán et al. 2001).

Esto significa que el principal papel fisiológico de los cuerpos cetónicos es transferir la energía derivada de los lípidos del hígado a los tejidos periféricos. De manera que en periodos de hipoglucemia o situaciones patológicas para mantener la energía a partir del metabolismo de la glucosa, los cuerpos cetónicos serán la principal fuente energética para el cerebro y bajo esas condiciones anómalas, la supervivencia cerebral será fuertemente (aunque no únicamente) dependiente de las reservas de triglicéridos periféricas (Fehm et al. 2006). Cabe destacar que en humanos, en los periodos prolongados de situaciones de ayuno o resistencia a la insulina, los cuerpos cetónicos aportan aproximadamente el 75% de las necesidades energéticas del cerebro (Cahill, 2006).

Los cuerpos cetónicos son sustancias hidrofílicas que no atraviesan fácilmente la BHE por lo que necesitan de proteínas transportadoras como los transportadores de monocarboxilatos (MCTs). La cetonemia prolongada por causas como, el hambre o la cetoacidosis diabética induce un aumento de la actividad de mecanismo de transporte que conduce los cuerpos cetónicos hacia el cerebro (Moore et al. 1976; Daniel et al. 1977; Pollay et al. 1980). De

hecho, se ha visto que el transporte del 3- β -hidroxibutirato en la rata adulta expuesta a 5 días de hambre o con dieta rica en grasas es de 2 a 4 veces mayor que la de una rata no expuesta a situaciones de cetonemia (Leino et al. 2001).

Aunque es asumido que es el hepatocito quien suministra los cuerpos cetónicos al resto de órganos, existen también ciertas evidencias que demuestran *in vitro* de que los astrocitos proveen de cuerpos cetónicos *in situ* a las neuronas, y aumentan las posibilidades metabólicas de supervivencia neuronal (Guzmán et al. 2001). También se han encontrado indicios de que los astrocitos podrían producir cuerpos cetónicos *in vivo* a partir de ácidos grasos (Guzmán et al. 2001) y leucina (Bixel et al. 1995).

2.4. Insulina y Enfermedad de Alzheimer

La señalización insulínica defectuosa se podría traducir en una mayor vulnerabilidad de las neuronas al estrés metabólico, acelerando su disfunción neuronal, asociado con un déficit cognitivo superior y desarrollo de demencia, incluyendo EA (de la Monte, 2009).

Alteraciones en la insulina y sus vías de señalización como factores de riesgo de EA

La EA parece compartir muchas de las características fisiopatológicas de la DM2 como insulino-resistencia y metabolismo de glucosa dañado, stress oxidativo e inflamatorio o agregación amiloide.

Los estudios epidemiológicos demuestran que la diabetes aumenta el riesgo de padecer demencia o AD de hasta un 65% más (Profenno et al. 2010; Ohara et al. 2011; Barbagallo et al. 2014). Otros estudios epidemiológicos señalan a la hiperinsulinemia periférica como factor que incrementa el riesgo para la demencia en general (Leibson et al. 1997). Una elevada proporción de afectados por la EA muestra altos niveles de insulina periféricos y baja utilización de glucosa, perfil que es característico de una resistencia a la insulina (Craft et al.

1999b). Además, diversos estudios muestran que en enfermos de EA los niveles de insulina en plasma son altos y en líquido cefalorraquídeo (LCR) bajos, ya en estadios iniciales de la EA (Craft et al. 1998; Gil-Bea et al. 2010) y que presentan un deterioro de la sensibilidad periférica a la insulina. En general, la sensibilidad a la insulina se asocia con los procesos de aprendizaje y memoria, de manera que un deterioro en el funcionamiento de la insulina implica una peor ejecución en tareas de aprendizaje y memoria tanto en ratas (Lannert et al. 1998) como en humanos (Craft et al. 2003; Craft et al. 1998). En este sentido, por ejemplo, la DM2 se ha asociado con un deterioro de la memoria verbal y visual en seres humanos (Perlmutter et al. 1984; Helkala et al. 1995; Elias et al. 1997; Strachan et al. 1997; Vanhanen et al. 1999; Reijmer et al. 2010).

Se ha propuesto que la insulino-resistencia periférica puede promover el inicio de la EA (Craft et al. 2005; Cole et al. 2007; Neumann et al. 2008; Sims-Robinson et al. 2010; Cholerton et al. 2011; Baker et al. 2011), pudiendo actuar como factor etiológico de la EA por sí sólo o bien asociado a la DM2 (Tan et al. 2011; Correia et al. 2011; Baker et al. 2011). La resistencia a la insulina, puede ser un proceso patológico subyacente dentro de los casos de EA (Schrijvers et al. 2010), disminución de activación de IR cerebrales, mayor carga de placas neuríticas (Ho et al. 2004; Matsuzaki et al. 2010) y menor metabolismo glucídico cerebral asociado a deterioro cognitivo (Baker et al. 2011; Rasgon et al. 2011).

La alteración de moléculas en la cascada de señalización insulínica cerebral, tales como el aumento de fosforilación de IRS-1 y 2, la disminución en la fosforilación o la desensibilización de IR, la disminución de pAKT, el aumento de fosforilación de GSK-3 β (Hoyer, 2002; Steen et al. 2005; Rivera et al. 2005; Griffin et al. 2005; Ma et al. 2009; Moloney et al. 2010; Liu et al. 2011) en la EA apoya la idea del desarrollo de una insulinoresistencia central en estadios tempranos de la enfermedad (Talbot et al. 2012; Ma et

al. 2015). Es por todo ello por lo que a la propia EA se le acuña el término de “diabetes tipo 3” (Steen et al. 2005).

No está claro si esta insulino resistencia central es causa o consecuencia de la EA. Aunque la evidencia apunta a que el fallo en la acción de la insulina parece tener un papel crucial en distintos factores de la progresiva patogenia de la EA.

Relación entre A β y la señalización de insulina

Además de la idea de que la resistencia a la insulina puede conducir a la patología de la EA, cabe también la posibilidad de que la propia patogenia de la enfermedad (en concreto la producción de A β) conduzca a alteraciones en la insulina. Todas las formas de A β (monómeros, oligómeros y formas difusibles de A β) se unen a los IR e impide la señalización de la insulina (Zhao et al. 2009). Intracelularmente, A β interrumpe la unión de AKT con PDK1 por ejemplo, impidiendo así la señalización insulínica (Frisardi et al. 2010) lo que se traduce en una menor fosforilación de AKT. Esto lleva a una activación de GSK3 β lo que resulta en una acumulación de pTau y de A β , retroalimentando el ciclo (Kim et al. 2012).

Por un lado, la insulina podría atenuar los efectos sinaptotóxicos de A β . La pérdida de sinapsis es el primer defecto estructural observado en EA. Especies solubles oligoméricas de A β son sinaptotóxicas, y la insulina previene la unión de A β en las sinapsis, preservando así la integridad sináptica (De Felice et al. 2009).

Por otro lado, la insulina influye en el metabolismo de APP, acelerando su tráfico a la membrana plasmática vía trans-Golgi donde es generado. Estos efectos de insulina sobre APP son mediados por la señalización vía Erk MAPK (Gasparini et al. 2002). Una señalización dañada provocaría un procesamiento anómalo de APP (de la Monte, 2009), lo que podría llevar a su posterior acumulación. Además el aporte de la insulina hace que disminuyan los

niveles plasmáticos de la APP en individuos sanos y en pacientes con EA (Dhmoon et al. 2009). La ausencia de señalización del IR en el cerebro aumenta el procesamiento de APP y la acumulación de A β , en un modelo *knockout* de IR cruzado con un modelo transgénico de EA (Tg2576) (Stöhr et al. 2013). La supresión de IR cerebral desemboca en una mayor fosforilación de Tau, aunque sin mostrar desorden en la memoria (Schubert et al. 2004) y el *knockout* de IRS2 disminuye la mortalidad en un modelo de EA (Freude et al. 2009). Se ha visto que la insulina puede revertir los efectos negativos sobre la memoria espacial inducidos por A β ₂₅₋₃₅ (Ghasemi et al. 2014). El tratamiento con secretagogos de insulina como la exendina-4 o la propia insulina, mejora la señal insulínica defectuosa asociada a A β o la hiperfosforilación de Tau, en modelos murinos diabéticos y de EA (Bomfim et al. 2012; Yang et al. 2013).

Además de en la producción, la insulina también puede participar en la acumulación de A β . Se ha visto que la insulina modula la concentración de A β *in vitro*, evitando así su acumulación. *In vivo*, la insulina puede regular la degradación del amiloide gracias al IDE (Farris et al. 2003). Esta enzima se encuentra presente además de en cerebro, en hígado, riñón y músculo (Authier et al. 1996) y juega un papel crucial en el aclaramiento cerebral del A β (Kurochkin et al. 1994; McDermott et al. 1997; Qiu et al. 2006). Aunque el sustrato principal de esta metaloproteasa es la insulina (posee mayor afinidad por la insulina que por A β), también se encarga de degradar el péptido A β (en sus distintas formas A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂) (Qiu et al. 2006). Una hiperinsulinemia por tanto podría inhibir la degradación de A β , bloqueando competitivamente la IDE (Farris et al. 2003). Esto es precisamente lo que puede ocurrir en diabéticos o individuos resistentes a la insulina: la cantidad elevada de insulina presente en el cerebro compite con el A β en la unión al IDE (Qiu et al. 2006) y como consecuencia desaparece la protección ofrecida por esta enzima frente a la formación de placas seniles y frente a la acción tóxica de los oligómeros. Confirmando esta hipótesis, estudios

histopatológicos han demostrado que en cerebros de pacientes de EA hay una menor expresión de esta enzima (McDermott et al. 1997; Vekrellis et al. 2000), existiendo una actividad de IDE que correlaciona negativamente con el contenido de A β (Miller et al. 2003; Farris et al. 2003). También ratones Tg2576 alimentados con dietas ricas en grasas expresan una menor actividad de IDE acompañado de una acumulación de A β (Zhao et al. 2004) y en ratones *knock-out* para esta enzima hay una menor degradación de A β (Farris et al. 2003).

3. Regulación de la neurotransmisión glutamatérgica modulada por insulina.

3.1. El glutamato

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante en el SNC de animales y está críticamente implicado en mecanismos de plasticidad sináptica, memoria y aprendizaje a través de LTP, entre otros (Revet et al. 2013; Pfund et al. 2000). La mayor parte de las neuronas excitadoras del SNC son glutamatérgicas y se estima que más del 60% de todas las sinapsis del encéfalo liberan este neurotransmisor (Danbolt, 2001).

El glutamato puede ser sintetizado por varias enzimas y en distintos procesos metabólicos pero es mayoritariamente a través de la síntesis *de novo* por los astrocitos donde se produce la mayor parte del glutamato (Nedergaard et al. 2002). Esencialmente todo el glutamato en el cerebro es sintetizado por transaminación del α -cetoglutarato en neuronas (Figura 11, a) y glia a través de la glutamato deshidrogenasa. A ese glutamato proveniente del ciclo de Krebs del astrocito se le une el glutamato recaptado desde el espacio extracelular por el propio astrocito para ser reciclado a glutamina por la glutamina sintetasa (Figura 11, e) antes de ser recogida por las neuronas (Schousboe et al. 1997). Una vez en las terminales presinápticas de las neuronas, la glutamina es convertida a glutamato por acción de glutaminasa activada por

fosfato (Figura 11, i) y éste es translocada hacia dentro del lumen de las vesículas presinápticas, vía los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT) (Takamori et al. 2000) (Figura 11, o). Así, el glutamato es almacenado en estas vesículas sinápticas que forman acúmulos cerca de la sinapsis. En respuesta a una despolarización, el aumento de niveles citosólicos de Ca^{+2} provoca la fusión de las vesículas con la membrana plasmática, liberando el glutamato almacenado a la hendidura sináptica y ejerciendo sus efectos vía receptores inotrópicos y metabotrópicos (Danbolt, 2001; Kew et al. 2005). (Figura 11).

Tras la recaptación de glutamato en las vesículas presinápticas, un paso esencial en la neurotransmisión de glutamato es la concentración de glutamato dentro de las vesículas antes de liberarse desde las terminales presinápticas por VGLUTs. La concentración de glutamato en la hendidura sináptica depende por lo tanto, del número de vesículas sinápticas, la concentración vesicular de glutamato y cambios en la actividad de los transportadores vesiculares (Williams, 1997).

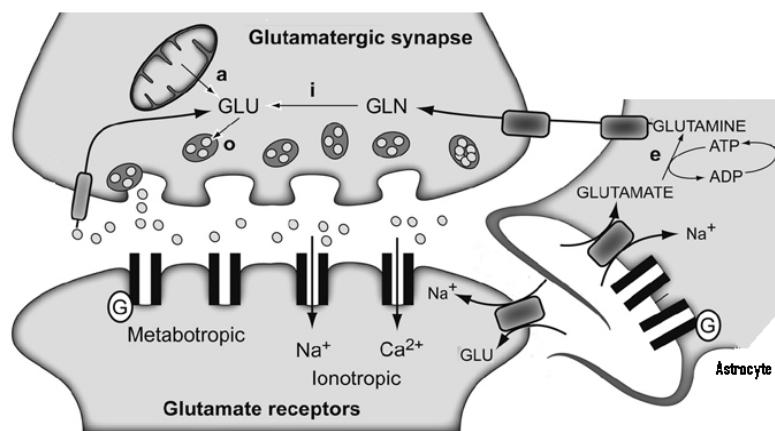


Figura 11. El glutamato liberado a la hendidura sináptica durante la neurotransmisión glutamatergica es cotransportado con Na^+ a los astrocitos. El glutamato astrocítico se transforma a glutamina (Gln) a través de la glutamina sintetasa (e), consumiendo una molécula de ATP. La glutamina recaptada por la neurona se convierte a glutamato a partir de la glutaminasa (i) que se suma al glutamato proveniente de la mitocondria (a). Todo el glutamato se introduce al lumen de las vesículas presinápticas, vía transportador vesicular de glutamato (VGLUT)(o). Una vez liberado, el glutamato (Glu) puede actuar por unión a los receptores inotrópicos; o por unión a los receptores metabotrópicos. Adaptado de (Maggistretti et al.1999) .

Hasta la fecha, han sido identificadas, molecular y funcionalmente, tres isoformas: VGLUT 1, 2 y 3 (Benarroch, 2010). VGLUT1 y VGLUT2 son expresados selectivamente en terminales glutamatérgicas presinápticas, mientras que VGLUT3 es expresado en el soma y dendritas de neuronas glutamatérgicas y no glutamatérgicas, además de astrocitos. (Herzog et al. 2004). A pesar de la distribución diseminada, ninguna de las regiones cerebrales expresa sólo una isoforma de VGLUT e incluso algunas neuronas coexpresan VGLUT1 y VGLUT2 (Herzog et al. 2006).

A pesar de su distinta y complementaria distribución en el SNC, todas las isoformas comparten similares características bioquímicas y farmacológicas (Fremeau et al. 2004). Estos transportadores vesiculares de glutamato confieren a las neuronas la capacidad de liberar exocíticamente el glutamato, y son los primeros marcadores específicos disponibles de las neuronas glutamatérgicas. Estudios iniciales sugirieron una expresión diferencial y complementaria de VGLUT1 y VGLUT2, con VGLUT1 expresado predominantemente en corteza cerebelar e hipocampo y VGLUT2, en neuronas subcorticales (Fremeau et al. 2001). Sin embargo, estudios recientes indican que estas dos isoformas son ocasionalmente coexpresadas en las mismas terminales sinápticas. VGLUT1 representa aproximadamente el 80% de la captación total de glutamato vesicular en el sistema nervioso central adulto. Experimentos en ratones *knock-out* VGLUT1 sugieren un papel destacado de este transportador en el mecanismo de plasticidad sináptica (Benarroch, 2010). Otros muchos estudios en ratón *knock-out* se han sumado para confirmar la importancia funcional del VGLUT1 (Fremeau et al. 2004; Wojcik et al. 2004; Tordera et al. 2007; Moechars et al. 2006; Seal et al. 2008). Estos estudios demuestran claramente la importancia del funcionamiento VGLUT1 en la señalización glutamatérgica *in vivo*.

En resumen, todas estas consideraciones reflejan un papel esencial de los VGLUTs en la transmisión glutamatérgica. Según lo anterior, se afianza la idea de que la concentración de

transportadores vesiculares impacta en la la transmisión sináptica con consecuencias funcionales sobre la plasticidad sináptica hipocampal (Balschun et al. 2010).

3.2. Sistema glutamatérgico en la Enfermedad de Alzheimer

Los marcadores patológicos, ONFs y placas seniles que se van desarrollando en los cerebros afectados por la EA, implican la disfunción paulatina de la neurotransmisión, donde el sistema glutamatérgico y colinérgico son los más afectados (Vogels et al. 1990; Neill, 1995).

Varios estudios han apuntado la existencia de una disfunción de la neurotransmisión glutamatérgica en la EA, incluyendo una menor concentración de glutamato, menor recaptación de glutamato en sinaptosomas así como una reducción de la unión de dicho glutamato a sus receptores en hipocampo de pacientes y cerebros postmortem de EA (Cowburn et al. 1988; Hardy et al. 1987). Un estudio reciente también apoya la hipótesis de una progresión patológica que resulta en unos niveles cada vez menores de metabolitos de glutamato, desde estadíos normales de envejecimiento, pasando por deterioro cognitivo leve hasta EA (Rupsingh et al. 2011). También se han detectado por resonancia magnética nuclear, menores niveles de glutamato en pacientes EA comparados con pacientes MCI (Fayed et al. 2011).

Alteraciones de la expresión de VGLUT en la EA

Varios estudios en los que se han analizado los niveles de expresión de VGLUT1 y VGLUT2 en tejido cerebral post-mortem de EA han conducido a resultados contradictorios. Un estudio propone que la densidad presináptica glutamatérgica parece estar elevada en pacientes con deterioro cognitivo leve y disminuida en etapas tanto leves como graves de EA

(Bell et al. 2007). Otro grupo demostró una reducción significativa de la expresión de VGLUT1 y VGLUT2 en la corteza prefrontal de pacientes con EA (Kashani et al. 2008). Otros describen niveles reducidos de VGLUT1 en la corteza parietal y occipital pero sin cambios en la corteza frontal de cerebros EA (Kirvell et al. 2006). Por último, en una investigación más reciente, la expresión VGLUT1 se correlacionó con el estado cognitivo, pero no se observó ningún cambio en la expresión VGLUT1 en la corteza prefrontal y temporal al comparar los cerebros de sujetos control y EA (Kirvell et al. 2010).

Los estudios en animales parecen más consistentes ya que se ha constatado la disminución de VGLUT1 tanto en modelos transgénicos de EA (Bell et al. 2006; Minkeviciene et al. 2008; Cassano et al. 2012; Mitew et al. 2013) como en modelos de administración de A β intracerebroventricular (Canas et al. 2014). Sólo un estudio muestra aumento de los niveles de VGLUT1 en ratones transgénicos de EA (Timmer et al. 2014).

Debido a la discrepancia entre los estudios, la participación de las sinapsis excitatorias glutamatérgicas en la patología de la EA aún no está clara.

Disfunción glutamatérgica mediada por A β

El A β aumentaría la sensibilidad neuronal al glutamato resultando en un incremento de la actividad sináptica neuronal. A β podría crear poros oligoméricos en la membrana que harían aumentar la liberación de glutamato a la sinapsis, predisponiendo las neuronas a la excitotoxicidad. El A β sobreactiva por lo tanto la actividad glutamatérgica, especialmente vía receptor NMDA (ver revisiones de Danysz et al. 2003; Klein et al. 2004; Walsh et al 2004b). La acumulación de A β activa NMDARs en estadios previos de la EA. Se ha visto un aumento en la actividad de las neuronas piramidales de la corteza entorrinal, el subículo y el CA1-3 del

hipocampo, aparte de una máxima actividad en la capa de la corteza entorrinal, en estadios tempranos de la EA (Gastard et al. 2003; Parameshwaran et al. 2008).

3.3. Relación entre insulina y sistema glutamatérgico

Diversos estudios sobre señalización del IR en el hipocampo sugieren que la insulina pudiera modular la plasticidad sináptica a través de varios mecanismos como el sistema glutamatérgico. Por ejemplo, la insulina provoca la expresión en la superficie celular de receptores de NMDA (Skeberdis et al. 2001) y estimula la fosforilación de subunidades de NMDA (GluN2A y GluN2B) en el hipocampo (Christie et al. 1999). La insulina además estimula la fosforilación y la endocitosis de GluA2 (subunidad del receptor AMPA) en preparaciones de tejido hipocampal (Ahmadian et al. 2004). Sobre las acciones excitotóxicas del glutamato en células de neuroblastoma humano, la insulina atenúa el daño excitotóxico generado por éste (Nampoothiri et al. 2014). También puede estimular la expresión del transportador de glutamato astrocítico GLT1 (Ji et al. 2011).

En la diabetes, las interacciones entre IR y glutamato parecen estar reprimidas, y este hecho podría contribuir a los déficits que media la diabetes en la plasticidad sináptica hipocampal. Por ejemplo, la unión del glutamato a su receptor AMPA (Gagné et al. 1997) y la funcionalidad de los receptores AMPA (Chabot et al. 1997; Di Luca et al. 1999; Kamal et al. 2006) están reducidas en el hipocampo de ratas diabéticas por estreptozotocina. En este mismo modelo de diabetes experimental, la proteína y el ARNm de la subunidad GluN2B de los receptores NMDA están también disminuidos en el hipocampo (Gardoni et al. 2002). La redistribución y la reorganización de PSD-95 (proteína de densidad postsináptica, que ancla los receptores de glutamato) puede ser un indicador de una sinaptogénesis alterada en el hipocampo de ratas diabéticas por estreptozocina (Grillo et al. 2005) y puede además armonizar el tono glutamatérgico por modulación de la expresión de receptores de superficie

de glutamato. La insulina no sólo aumenta la recaptación de glucosa sino que además normaliza la recaptación de glutamato en astrocitos (Coleman et al. 2010), apuntando un posible defecto en la transmisión de la señal glutamatérgica de un cerebro DM2, dado su deterioro en la recaptación del glutamato astroglial (Brands et al. 2005). En otros modelos de DM1 también se observó una menor expresión de transportadores de glutamato astroglial EAAT-1 (Li et al. 2002).

Se ha visto en pacientes de DM1 desórdenes en los niveles de glutamato, habiendo mayor disponibilidad de glutamato en la región prefrontal (Lyo et al. 2009) o menor disponibilidad en la corteza occipital o parieto-occipital (Mangia et al. 2013).

VGLUTs: Diana modulada por cuerpos cetónicos

Los cuerpos cetónicos son considerados como responsables del efecto terapéutico del ayuno y la dieta cetogénica en los estados epilépticos (Hartman et al. 2007). Recientemente, se ha demostrado evidencia de una posible relación entre neurotransmisión glutamatérgica y cuerpos cetónicos, a través de una regulación anión-dependiente de la actividad de VGLUT (Juge et al. 2010).

La captación de glutamato en las vesículas sinápticas muestra una dependencia bifásica del Cl^- (Naito et al. 1985; Carlson et al. 1989; Bellocchio et al. 2000; Bai et al. 2001; Varoqui et al. 2002), de manera que a bajas concentraciones de Cl^- citoplasmático el transporte de glutamato es despreciable, mientras que un incremento en la concentración de Cl^- activa el transporte.

Basándose en este hecho, Juge y col. demostraron que cuando los cuerpos cetónicos están presentes, la dependencia de Cl^- de VGLUTs se modifica y son necesarias mayores concentraciones de Cl^- para mantener la actividad del transporte. Por lo tanto, la regulación de

VGLUTs por Cl^- funciona como un interruptor para activar el almacenamiento vesicular, e influye en la posterior liberación de glutamato (Figura 12). Los cuerpos cetónicos actúan como moduladores fisiológicos, reversibles y no tóxicos de este interruptor. En condiciones normales, el interruptor está continuamente activo, pero cuando la concentración de cuerpos cetónicos se eleva lo suficiente, el interruptor se apaga (Juge et al. 2010).

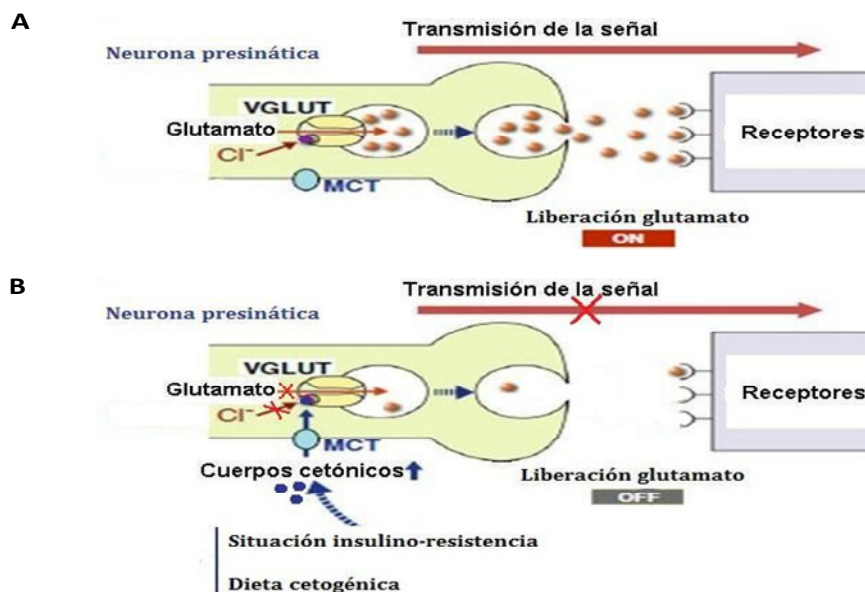


Figura 12. Modo de acción propuesto de cuerpos cetónicos en la supresión de la neurotransmisión glutamatergica mediada por VGLUT. (A) El estado de actividad de VGLUT es fuertemente dependiente de la unión de Cl^- , lo que se traduciría en una neurotransmisión glutamatergica normal. (B) El aumento de concentración de cuerpos cetónicos circulantes puede eficazmente suprimir la actividad de VGLUT llevando a una reducción en la liberación de glutamato. Ello provocaría una disminución en la neurotransmisión excitatoria. Adaptado de Juge et al. (2010).

La evidencia ha demostrado que la modulación en la función de VGLUTs por los cuerpos cetónicos es específica de neuronas. Aunque todas las isoformas VGLUT presentan afinidad similar por acetoacetato, el acetoacetato no parece tener efecto sobre la liberación vesicular de glutamato en los astrocitos (Juge et al. 2010). Es posible que los cuerpos cetónicos sean transportados con diferente eficiencia debido a las diferencias entre transportadores expresados en neuronas y astrocitos y que esto pueda conducir a diferentes accesibilidades de

los cuerpos cetónicos al sitio de unión del Cl^- en la molécula de VGLUT (Bergersen et al. 2002; Debernardi et al. 2003).

Todo lo anterior podría explicar el por qué del uso de dietas cetogénicas y la restricción calórica en el tratamiento de la epilepsia, enfermedad que cursa con aumento de tono glutamatérgico. La ingesta de carbohidratos por el contrario, disminuye los niveles de cuerpos cetónicos, que rápidamente se convierte en una señal de activación del VGLUT, lo que lleva al almacenamiento de glutamato en las vesículas sinápticas, y la restauración de la neurotransmisión glutamatérgica (Juge et al. 2010).

Referencias

Abbott, M. A., Wells, D. G., and Fallon, J. R. 1999. «The Insulin Receptor Tyrosine Kinase Substrate p58/53 and the Insulin Receptor Are Components of CNS Synapses». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (17): 7300-7308.

Ahmadian, G., Ju, W., Liu, L., Wyszynski, M., Lee, S.H., Dunah, A.W., Taghibiglou, C., et al. 2004. «Tyrosine Phosphorylation of GluR2 is required for Insulin-Stimulated AMPA Receptor Endocytosis and LTD». *The EMBO Journal* 23 (5): 1040-50.

Aisen, P.S., Gauthier, G., Ferris, S.H., Saumier, D., Haine, D., Garceau, D., Duong, A., et al. 2011. «Tramiprosate in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease - a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multi-Centre Study (the Alphase Study)». *Archives of Medical Science: AMS* 7 (1): 102-11.

Ajilore, O., Haroon, E., Kumaran, S., Darwin, C., Binesh, N., Mintz, J., Miller, J., Thomas, M.A. and Kumar, A. 2007. «Measurement of Brain Metabolites in Patients with Type 2 Diabetes and Major Depression Using Proton Magnetic Resonance Spectroscopy». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32 (6): 1224-31.

Angevaren, M., Aufdemkampe, G., Verhaar, H.J.J., Aleman, A., and Vanhees, L. 2008. «Physical Activity and Enhanced Fitness to Improve Cognitive Function in Older People without Known Cognitive Impairment». *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, n.º 2: CD005381.

Arnold, S. E., Hyman, B. T., Flory, J., Damasio, A.R., and Van Hoesen, G.W. 1991. «The Topographical and Neuroanatomical Distribution of Neurofibrillary Tangles and Neuritic Plaques in the Cerebral Cortex of Patients with Alzheimer's Disease». *Cerebral Cortex* 1 (1): 103-16.

Artola, A., Kamal, A., Ramakers, G. M. J., Biessels, G. J., and Gispen, W. H. 2005.

«Diabetes Mellitus Concomitantly Facilitates the Induction of Long-Term Depression and Inhibits that of Long-Term Potentiation in Hippocampus». *The European Journal of Neuroscience* 22 (1): 169-78.

Attwell, D. and Laughlin, S.B.. 2001. «An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21 (10): 1133-45.

Auestad, N., Korsak, R.A., Morrow, J. W. and Edmond, J. 1991. «Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis by Astrocytes in Primary Culture». *Journal of Neurochemistry* 56 (4): 1376-86.

Authier, F., Posner, B. I., and Bergeron, J. J. 1996. «Insulin-Degrading Enzyme». *Clinical and Investigative Medicine. Médecine Clinique Et Experimentale* 19 (3): 149-60.

Avila, J. 2006. «Tau Phosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease Pathology». *FEBS Letters* 580 (12): 2922-27.

Bailey, E. E., Pfeifer, H.H., and Thiele E.A. 2005. «The Use of Diet in the Treatment of Epilepsy». *Epilepsy & Behavior: E&B* 6 (1): 4-8.

Bai, L., Xu, H., Collins, J. F. and Ghishan, F.K. 2001. «Molecular and Functional Analysis of a Novel Neuronal Vesicular Glutamate Transporter». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (39): 36764-69.

Baker, L. D., Cross, D. J., Minoshima, S., Belongia, D., Watson, G. S., and 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.

Balschun, D., Moechars, D., Callaerts-Vegh, Z., Vermaercke, B., Van Acker, N., Andries, L., and D'Hooge, R. 2010. «Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1 has a Role in hippocampal Long-Term Potentiation and Spatial Reversal Learning». *Cerebral Cortex* 20 (3): 684-93.

Banks, W. A., Jaspan, J. B., Huang, W., and Kastin, A. J. 1997. «Transport of Insulin across the Blood-Brain Barrier: Saturability at Euglycemic Doses of Insulin». *Peptides* 18 (9): 1423-29.

Barbagallo, M., and Dominguez, L. J. 2014. «Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease». *World Journal of Diabetes* 5 (6): 889-93.

Barghorn, S., Nimmrich, V., Striebinger, A., Krantz, C., Keller, P., Janson, B., Bahr M., et al. 2005. «Globular Amyloid Beta-Peptide Oligomer - a Homogenous and Stable Neuropathological Protein in Alzheimer's Disease». *Journal of Neurochemistry* 95 (3): 834-47.

Barnes, D.E., Whitmer, R.A., and Yaffe, K. 2007. «Physical Activity and Dementia: The Need for Prevention Trials». *Exercise and Sport Sciences Reviews* 35 (1): 24-29.

Baskin, D. G., Figlewicz, D. P., Woods, S. C., Porte, D., and Dorsa, D.M. 1987. «Insulin in the Brain». *Annual Review of Physiology* 49: 335-47.

Baudry, M. and Lynch G. 2001. «Remembrance of Arguments Past: How Well Is the Glutamate Receptor Hypothesis of LTP Holding up after 20 Years?». *Neurobiology of Learning and Memory* 76 (3): 284-97.

Baura, G. D., Foster, D. M., Porte, D., Kahn, S. E., Bergman, R. N., Cobelli, C. and 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): 1824-30.

Beckett, M. W., Arden, C. I., and Rotondi, M. A. 2015. «A Meta-Analysis of Prospective Studies on the Role of Physical Activity and the Prevention of Alzheimer's Disease in Older Adults». *BMC Geriatrics* 15: 9.

Behl, M., Zhang, Y. and Zheng W. 2009. «Involvement of Insulin-Degrading Enzyme in the Clearance of Beta-Amyloid at the Blood-CSF Barrier: Consequences of Lead Exposure».

Cerebrospinal Fluid Research 6: 11.

Bell, K. F. S., Bennett, D. A., and Cuello, A. C. 2007. «Paradoxical Upregulation of Glutamatergic Presynaptic Boutons during Mild Cognitive Impairment». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (40): 10810-17.

Bell, K. F. S., and Cuello, A. C. 2006. «Altered Synaptic Function in Alzheimer's Disease». *European Journal of Pharmacology* 545 (1): 11-21.

Bellocchio, E. E., Reimer, R. J., Fremeau, R. T., and Edwards, R. H. 2000. «Uptake of Glutamate into Synaptic Vesicles by an Inorganic Phosphate Transporter». *Science (New York, N.Y.)* 289 (5481): 957-60.

Benarroch, E. E. 2010. «Glutamate Transporters: Diversity, Function, and Involvement in Neurologic Disease». *Neurology* 74 (3): 259-64.

Benedict, C., Frey, W. H., Schiöth, H. B., Schultes, B., Born, J. and Hallschmid, M. 2011. «Intranasal Insulin as a Therapeutic Option in the Treatment of Cognitive Impairments». *Experimental Gerontology* 46 (2-3): 112-15.

Benedict, C., Hallschmid, M., Schultes, B., Born, J. and Kern, W. 2007. «Intranasal Insulin to Improve Memory Function in Humans». *Neuroendocrinology* 86 (2): 136-42.

Benilova, I., Karran, E. and De Strooper, B. 2012. «The Toxic A β Oligomer and Alzheimer's Disease: An Emperor in Need of Clothes». *Nature Neuroscience* 15 (3): 349-57.

Bergersen, L., Rafiki, A. and Ottersen, O. P. 2002. «Immunogold Cytochemistry Identifies Specialized Membrane Domains for Monocarboxylate Transport in the Central Nervous System». *Neurochemical Research* 27 (1-2): 89-96.

Bettens, K., Slegers, K. and Van Broeckhoven, C. 2013. «Genetic Insights in Alzheimer's Disease». *The Lancet. Neurology* 12 (1): 92-104.

Biessels, G. J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C. and Scheltens, P. 2006. «Risk of Dementia in Diabetes Mellitus: A Systematic Review». *The Lancet. Neurology* 5 (1): 64-74.

Biessels, G. J., Kamal, A., Ramakers, G. M., Urban, I. J., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W. and Gispen, W. H. 1996. «Place Learning and Hippocampal Synaptic Plasticity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats». *Diabetes* 45 (9): 1259-66.

Biffi, A., Shulman, J. M., Jagiella, J. M., Cortellini, L., Ayres, A. M., Schwab, K., Brown, d. L. et al. 2012. «Genetic Variation at CR1 Increases Risk of Cerebral Amyloid Angiopathy». *Neurology* 78 (5): 334-41.

Billings, L. M., Green, K. N., McGaugh, J. L. and LaFerla F. M. 2007. «Learning Decreases A beta*56 and Tau Pathology and Ameliorates Behavioral Decline in 3xTg-AD Mice». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (4): 751-61.

Bixel, M. G. and Hamprecht B. 1995. «Generation of Ketone Bodies from Leucine by Cultured Astroglial Cells». *Journal of Neurochemistry* 65 (6): 2450-61.

Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V., and Ruiz-Albusac, J. M. 2014. «Insulin in the Brain: Its Pathophysiological Implications for States Related with Central Insulin Resistance, Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease». *Frontiers in Endocrinology* 5: 161.

Bomfim, R. R., Forny-Germano, L., Sathler, L. B., Brito-Moreira, J., Houzel, J. C., Decker, H., Silverman, M. A. et al. 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): 1339-53.

Borgegard, T., Juréus, A., Olsson, F., Rosqvist, S., Sabirsh, A., Rotticci, D., Paulsen, K. et al. 2012. «First and Second Generation Γ -Secretase Modulators (GSMs) Modulate Amyloid-B (A β) Peptide Production through Different Mechanisms». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (15): 11810-19.

Boura-Halfon, S., and Zick, Y. 2009. «Phosphorylation of IRS Proteins, Insulin Action, and Insulin Resistance». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 296 (4): E581-91.

- Braak, E., Braak, H. and Mandelkow, E. M.** 1994. «A Sequence of Cytoskeleton Changes Related to the Formation of Neurofibrillary Tangles and Neuropil Threads». *Acta Neuropathologica* 87 (6): 554-67.
- Braak, H., y Braak, E.** 1995. «Staging of Alzheimer's Disease-Related Neurofibrillary Changes». *Neurobiology of Aging* 16 (3): 271-78; discussion 278-84.
- Brands, A. M. A., Biessels, G. J., de Haan, E. H. F., Kappelle, L. J. and Kessels, R. P. C.** 2005. «The Effects of Type 1 Diabetes on Cognitive Performance: A Meta-Analysis». *Diabetes Care* 28 (3): 726-35.
- Bremner, J. D., Narayan, M., Anderson, E. R., Staib, L. H., Miller, H. L. and Charney, D. S.** 2000. «Hippocampal Volume Reduction in Major Depression». *The American Journal of Psychiatry* 157 (1): 115-18.
- Broersen, K., Rousseau, F. and Schymkowitz, J.** 2010. «The Culprit behind Amyloid Beta Peptide Related Neurotoxicity in Alzheimer's Disease: Oligomer Size or Conformation?». *Alzheimer's Research & Therapy* 2 (4): 12.
- Brown, A. M.** 2004. «Brain Glycogen Re-Awakened». *Journal of Neurochemistry* 89 (3): 537-52.
- Brown, A. M., and Ransom, B. R.** 2007. «Astrocyte Glycogen and Brain Energy Metabolism». *Glia* 55 (12): 1263-71.
- Brunet, A., Datta, S. R., and Greenberg, M. E.** 2001. «Transcription-Dependent and -Independent Control of Neuronal Survival by the PI3K-Akt Signaling Pathway». *Current Opinion in Neurobiology* 11 (3): 297-305.
- Buée, L., Blum, D., Bombois, S., Buée-Scherrer, V., Caillet-Boudin, M. L., Colin, M., Deramecourt, V. et al.** 2010. «Molecular actors in Alzheimer's disease: which diagnostic and therapeutic consequences?». *Thérapie* 65 (5): 401-7.
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J. and Yankner, B. A.** 1995. «Beta-Amyloid Fibrils Induce

Tau Phosphorylation and Loss of Microtubule Binding». *Neuron* 14 (4): 879-88.

Cagnin, A., Brooks, D. J., Kennedy, A. M., Gunn, R. N., Myers, R., Turkheimer, F. E., Jones, T., and Banati, R. B. 2001. «In-Vivo Measurement of Activated Microglia in Dementia». *Lancet* 358 (9280): 461-67.

Cahill, G. F. 2006. «Fuel Metabolism in Starvation». *Annual Review of Nutrition* 26: 1-22.

Canas, P. M., Simões, A. P., Rodrigues, R. J. and Cunha, R. A. 2014. «Predominant Loss of Glutamatergic Terminal Markers in a B-Amyloid Peptide Model of Alzheimer's Disease». *Neuropharmacology* 76 Pt A (January): 51-56.

Carlson, M. D., Kish, P. E. and Ueda, T. 1989. «Characterization of the Solubilized and Reconstituted ATP-Dependent Vesicular Glutamate Uptake System». *The Journal of Biological Chemistry* 264 (13): 7369-76.

Cassano, T., Serviddio, G., Gaetani, S., Romano, A., Dipasquale, P., Cianci, S., Bellanti, F. et al. 2012. «Glutamatergic Alterations and Mitochondrial Impairment in a Murine Model of Alzheimer Disease». *Neurobiology of Aging* 33 (6): 1-12.

Cavallucci, V., D'Amelio, M., and Cecconi, F. 2012. «A β Toxicity in Alzheimer's Disease». *Molecular Neurobiology* 45 (2): 366-78.

Cefalu, W. T. 2001. «Insulin Resistance: Cellular and Clinical Concepts». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 226 (1): 13-26.

Chabot, C., Massicotte, G., Milot, M., Trudeau, F., and Gagné, J. 1997. «Impaired Modulation of AMPA Receptors by Calcium-Dependent Processes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats». *Brain Research* 768 (1-2): 249-56.

Chadwick, W., Mitchell, N., Carroll, J., Zhou, Y., Park, S. S., Wang, L., Becker, K. G. et al. 2011. «Amitriptyline-Mediated Cognitive Enhancement in Aged 3 \times Tg Alzheimer's Disease Mice Is Associated with Neurogenesis and Neurotrophic Activity». *PloS One* 6 (6): e21660.

Chang, W. P., Koelsch, G., Wong, S., Downs, D., Da, H., Weerasena, V., Gordon, B. et al.

2004. «In Vivo Inhibition of Abeta Production by Memapsin 2 (beta-Secretase) Inhibitors». *Journal of Neurochemistry* 89 (6): 1409-16.

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 (5): 708-19.

Choi, I. Y. and Gruetter, R. 2003. «In Vivo ¹³C NMR Assessment of Brain Glycogen Concentration and Turnover in the Awake Rat». *Neurochemistry International* 43 (4-5): 317-22.

Cholerton, B., Baker, L. D. and Craft. S. 2011. «Insulin Resistance and Pathological Brain Ageing». *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 28 (12): 1463-75.

Christie, J. M., Wenthold, R. J. and Monaghan, D. T. 1999. «Insulin Causes a Transient Tyrosine Phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA Receptor Subunits in Rat Hippocampus». *Journal of Neurochemistry* 72 (4): 1523-28.

Chun, W. and Johnson, G. V. W. 2007. «The Role of Tau Phosphorylation and Cleavage in Neuronal Cell Death». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 12: 733-56.

Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J. and Ashe, K. H. 2005. «Natural Oligomers of the Amyloid-Beta Protein Specifically Disrupt Cognitive Function». *Nature Neuroscience* 8 (1): 79-84.

Cole, A. R., Astell, A., Green, C. and Sutherland, C. 2007. «Molecular Connexions between Dementia and Diabetes». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31 (7): 1046-63.

Coleman, E. S., Dennis, J. C., Braden, T. D., Judd, R. L. and Posner, P. 2010. «Insulin Treatment Prevents Diabetes-Induced Alterations in Astrocyte Glutamate Uptake and GFAP Content in Rats at 4 and 8 Weeks of Diabetes Duration». *Brain Research* 1306 (January): 131-41.

Conrad, C. D. 2008. «Chronic Stress-Induced Hippocampal Vulnerability: The Glucocorticoid Vulnerability Hypothesis». *Reviews in the Neurosciences* 19 (6): 395-411.

Correia, S. C., Santos, R. X., Perry, G., Zhu, X., Moreira, P. I. and Smith, M. A. 2011. «Insulin-Resistant Brain State: The Culprit in Sporadic Alzheimer's Disease?». *Ageing Research Reviews* 10 (2): 264-73.

Cowburn, R., Hardy, J., Roberts, P.m and Briggs, R. 1988. «Presynaptic and Postsynaptic Glutamatergic Function in Alzheimer's Disease». *Neuroscience Letters* 86 (1): 109-13.

Craft, S., Asthana, S., Newcomer, J. W., Wilkinson, C. W., Matos, I. T., Baker, L. D., Cherrier, M. et al. 1999a. «Enhancement of Memory in Alzheimer Disease with Insulin and Somatostatin, but Not Glucose». *Archives of General Psychiatry* 56 (12): 1135-40.

Craft, S., Asthana, S., Schellenberg, G., Cherrier, M., Baker, L. D., Newcomer, J., Plymate, S. et al. 1999b. «Insulin Metabolism in Alzheimer's Disease Differs according to Apolipoprotein E Genotype and Gender». *Neuroendocrinology* 70 (2): 146-52.

Craft, S., Newcomer, J., Kanne, S., Dagogo-Jack, S., Cryer, P., Sheline, Y., Luby, J., Dagogo-Jack, A. and Alderson, A. 1996. «Memory Improvement Following Induced Hyperinsulinemia in Alzheimer's Disease». *Neurobiology of Aging* 17 (1): 123-30.

Craft, S., Peskind, E., Schwartz, M. W., Schellenberg, G. D., Raskind, M. and Porte, D. 1998. «Cerebrospinal Fluid and Plasma Insulin Levels in Alzheimer's Disease: Relationship to Severity of Dementia and Apolipoprotein E Genotype». *Neurology* 50 (1): 164-68.

Craft, S. 2005. «Insulin Resistance Syndrome and Alzheimer's Disease: Age- and Obesity-Related Effects on Memory, Amyloid, and Inflammation». *Neurobiology of Aging* 26 Suppl 1 (December): 65-69.

Craft, S., Asthana, S., Cook, D. G., Baker, L. D., Cherrier, M., Purganan, K., Wait, C. et al. 2003. «Insulin Dose-Response Effects on Memory and Plasma Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease: Interactions with Apolipoprotein E Genotype». *Psychoneuroendocrinology* 28 (6): 809-22.

Craft, S., Baker, L. D., Montine, T. J., Minoshima, S., Watson, G. S., Claxton, A., Arbuckle,

M. et al. 2012. «Intranasal Insulin Therapy for Alzheimer Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment: A Pilot Clinical Trial». *Archives of Neurology* 69 (1): 29-38.

Craft, S., Zallen, G. and Baker, L. D. 1992. «Glucose and Memory in Mild Senile Dementia of the Alzheimer Type». *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 14 (2): 253-67.

Cramer, P. E., Cirrito, J. R., Wesson, D. W., Lee, C. Y. D., Karlo, J. C., Zinn, A. E., Casali, B. T. et al. 2012. «ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear B-Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models». *Science*. 335 (6075): 1503-6.

Cruz, J. C., Kim, D., Moy, L. Y., Dobbin, M. M., Sun, X., Bronson, R. T. and Tsai, L. H. 2006. «p25/cyclin-Dependent Kinase 5 Induces Production and Intraneuronal Accumulation of Amyloid Beta in Vivo». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (41): 10536-41.

Cuadrado-Tejedor, M., Ricobaraza, A., Frechilla, D., Franco, R., Pérez-Mediavilla, A., García-Osta, A. 2012 «Chronic Mild Stress Accelerates The Onset and Progression Of The Alzheimer's Disease Phenotype In Tg2576 Mice» *Journal Alzheimer Disease* 28 (3): 567-78.

Dahlgren, K. N., Manelli, A. M., Stine, W. B., Baker, L. K., Krafft, G. A. and LaDu, M. J. 2002. «Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid-Beta Peptides Differentially Affect Neuronal Viability». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (35): 32046-53.

Danbolt, N. C. 2001. «Glutamate Uptake». *Progress in Neurobiology* 65 (1): 1-105.

Daniel, P. M., Love, E. R., Moorhouse, S. R. and Pratt, O. E. 1977. «The Transport of Ketone Bodies into the Brain of the Rat (in Vivo)». *Journal of the Neurological Sciences* 34 (1): 1-13.

Danysz, W. and 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 (1): S23-32.

Debernardi, R., Pierre, K., Lengacher, S., Magistretti, P. J., and Pellerin, L. 2003. «Cell-

Specific Expression Pattern of Monocarboxylate Transporters in Astrocytes and Neurons Observed in Different Mouse Brain Cortical Cell Cultures». *Journal of Neuroscience Research* 73 (2): 141-55.

De Bruijn, R. F. A. G. and Ikram, M. A. 2014. «Cardiovascular Risk Factors and Future Risk of Alzheimer's Disease». *BMC Medicine* 12: 130.

De Felice, F. G., Vieira, M. N. N., Bomfim, T. R., Decker, H., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K. L., Zhao, W. Q., Ferreira, S. T. and Klein, W. L. 2009. «Protection of Synapses against Alzheimer's-Linked Toxins: Insulin Signaling Prevents the Pathogenic Binding of Abeta Oligomers». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (6): 1971-76.

De la Monte, S. M. 2009. «Insulin Resistance and Alzheimer's Disease». *BMB Reports* 42 (8): 475-81.

De la Monte, S. M. 2012. «Brain Insulin Resistance and Deficiency as Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease». *Current Alzheimer Research* 9 (1): 35-66.

Devaskar, S. U., Giddings, S. J., Rajakumar, P. A., Carnaghi, L. R., Menon, R. K. and Zahm, D. S. 1994. «Insulin Gene Expression and Insulin Synthesis in Mammalian Neuronal Cells». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (11): 8445-54.

Devaskar, S. U., Singh, B. S., Carnaghi, L. R., Rajakumar, P. A., and Giddings, S. J. 1993. «Insulin II Gene Expression in Rat Central Nervous System». *Regulatory Peptides* 48 (1-2): 55-63.

Dhamoon, M. S., Noble, J. M. and Craft, S. 2009. «Intranasal Insulin Improves Cognition and Modulates Beta-Amyloid in Early AD». *Neurology* 72 (3): 292-93

Di Luca, M., Ruts, L., Gardoni, F., Cattabeni, F., Biessels, G. J. and Gispen, W. H. 1999. «NMDA Receptor Subunits Are Modified Transcriptionally and Post-Translationally in the Brain of Streptozotocin-Diabetic Rats». *Diabetologia* 42 (6): 693-701.

Di Paolo, G. and Kim, T. W. 2011. «Linking Lipids to Alzheimer's Disease: Cholesterol and beyond». *Nature Reviews. Neuroscience* 12 (5): 284-96.

Dorn, A., Rinne, A., Bernstein, H. G., Hahn, H. J. and Ziegler, M. 1983. «Insulin and C-Peptide in Human Brain Neurons (insulin/C-peptide/brain peptides/immunohistochemistry/radioimmunoassay)». *Journal Für Hirnforschung* 24 (5): 495-99.

Echeverria, V., Ducatenzeiler, A., Dowd, E., Jänne, J., Grant, S. M., Szyf, M., Wandosell, F. et al. 2004. «Altered Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling, Tau Hyperphosphorylation and Mild Spatial Learning Dysfunction in Transgenic Rats Expressing the Beta-Amyloid Peptide Intracellularly in Hippocampal and Cortical Neurons». *Neuroscience* 129 (3): 583-92.

Eisenberg, D. and Jucker, M. 2012. «The Amyloid State of Proteins in Human Diseases». *Cell* 148 (6): 1188-1203.

Elias, P. K., Elias, M. F., D'Agostino, R. B., Cupples, L. A., Wilson, P. W., Silbershatz, H. and Wolf, P. A. 1997. «NIDDM and Blood Pressure as Risk Factors for Poor Cognitive Performance. The Framingham Study». *Diabetes Care* 20 (9): 1388-95.

Escobar, M. L., and Derrick, B. 2007. «Long-Term Potentiation and Depression as Putative Mechanisms for Memory Formation». En *Neural Plasticity and Memory*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3912/>.

Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E. A., Frosch, M. P., Eckman, C. B., Tanzi, R. E., Selkoe, D. J. and Guenette, S. 2003. «Insulin-Degrading Enzyme Regulates the Levels of Insulin, Amyloid Beta-Protein, and the Beta-Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain in Vivo». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 4162-67.

Fayed, N., Modrego, P. J., Rojas-Salinas, G. and Aguilar, K. 2011. «Brain Glutamate Levels Are Decreased in Alzheimer's Disease: A Magnetic Resonance Spectroscopy Study». *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias* 26 (6): 450-56.

Fehm, H. L., Kern, W. and Peters, A. 2006. «The Selfish Brain: Competition for Energy Resources». *Progress in Brain Research* 153: 129-40.

Figueiredo-Pereira, M. E., Efthimiopoulos, S., Tezapsidis, N., Buku, A., Ghiso, J., Mehta, P., and Robakis, N. K. 1999. «Distinct Secretases, a Cysteine Protease and a Serine Protease, Generate the C Termini of Amyloid Beta-Proteins Abeta1-40 and Abeta1-42, Respectively». *Journal of Neurochemistry* 72 (4): 1417-22.

Florent-Béchar, S., Desbène, C., Garcia, P., Allouche, A., Youssef, I., Escanyé, M. C., Koziel, V. et al. 2009. «The Essential Role of Lipids in Alzheimer's Disease». *Biochimie* 91 (6): 804-9.

Francis, P. T., Nordberg, A. and Arnold, S. E. 2005. «A Preclinical View of Cholinesterase Inhibitors in Neuroprotection: Do They Provide More than Symptomatic Benefits in Alzheimer's Disease?». *Trends in Pharmacological Sciences* 26 (2): 104-11.

Freiherr, J. Hallschmid, M., Frey, W. H., Brünner, Y. F., Chapman, C. D., Hölscher, C., Craft, S., De Felice, F. G., and Benedict, C. 2013. «Intranasal Insulin as a Treatment for Alzheimer's Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence». *CNS Drugs* 27 (7): 505-14.

Freneau, R. T., Kam, K., Qureshi, T., Johnson, J., Copenhagen, D. R., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F. A., Nicoll, R. A. and Edwards, R. H. 2004. «Vesicular Glutamate Transporters 1 and 2 Target to Functionally Distinct Synaptic Release Sites». *Science (New York, N.Y.)* 304 (5678): 1815-19.

Freneau, R. T., Troyer, M. D., Pahner, I., Nygaard, G. O., Tran, C. H., Reimer, R. J., Bellocchio, E. E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J. and Edwards, R. H. 2001. «The Expression of Vesicular Glutamate Transporters Defines Two Classes of Excitatory Synapse». *Neuron* 31 (2): 247-60.

Freude, S., Hettich, M. M., Schumann, C., Stöhr, O., Koch, L., Köhler, C., Udelhoven, M.

- et al. 2009. «Neuronal IGF-1 Resistance Reduces A β Accumulation and Protects against Premature Death in a Model of Alzheimer's Disease». *The FASEB Journal* 23 (10): 3315-24.
- Frisardi, V., Solfrizzi, V., Capurso, C., Imbimbo, B. P., Vendemiale, G., Seripa, D., Pilotto, A. and Panza, F.** 2010. «Is Insulin Resistant Brain State a Central Feature of the Metabolic-Cognitive Syndrome?». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 21 (1): 57-63.
- Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H. G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., Muschner, D. et al.** 1998. «Brain Insulin and Insulin Receptors in Aging and Sporadic Alzheimer's Disease». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 105 (4-5): 423-38.
- Gagné, J., Milot, M., Gélinas, S., Lahsaïni, A., Trudeau, F., Martinoli, M. G., and Massicotte, G.** 1997. «Binding Properties of Glutamate Receptors in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats». *Diabetes* 46 (5): 841-46.
- Gammelsaeter, R., Coppola, T., Marcaggi, P., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F. A., Attwell, D., Regazzi, R. and Gundersen, V.** 2011. «A Role for Glutamate Transporters in the Regulation of Insulin Secretion». *PloS One* 6 (8): e22960.
- Gardoni, F., Kamal, A., Bellone, C., Biessels, G. J., Ramakers, G. M. J., Cattabeni, F., Gispen, W. H. and Di Luca, M.** 2002. «Effects of Streptozotocin-Diabetes on the Hippocampal NMDA Receptor Complex in Rats». *Journal of Neurochemistry* 80 (3): 438-47.
- Garwood, C. J., Pooler, A. M., Atherton, J., Hanger, D. P. and Noble, W.** 2011. «Astrocytes Are Important Mediators of A β -Induced Neurotoxicity and Tau Phosphorylation in Primary Culture». *Cell Death & Disease* 2: e167.
- Gasparini, L., Netzer, W. Z., Greengard, P. and Xu, H.** 2002. «Does Insulin Dysfunction Play a Role in Alzheimer's Disease?». *Trends in Pharmacological Sciences* 23 (6): 288-93.
- Gastard, M. C., Troncoso, J. C. and Koliatsos, V. E.** 2003. «Caspase Activation in the Limbic Cortex of Subjects with Early Alzheimer's Disease». *Annals of Neurology* 54 (3):

393-98.

Gerozissis, K. and Kyriaki, G. 2003. «Brain Insulin: Regulation, Mechanisms of Action and Functions». *Cellular and Molecular Neurobiology* 23 (1): 1-25.

Gervais, F., Paquette, J., Morissette, C., Krzywkowski, P., Yu, M., Azzi, M., Lacombe, D. et al. 2007. «Targeting Soluble Abeta Peptide with Tramiprosate for the Treatment of Brain Amyloidosis». *Neurobiology of Aging* 28 (4): 537-47.

Ghasemi, R., Zarifkar, A., Rastegar, K., Maghsoudi, N. and Moosavi, M. 2014. «Insulin Protects against A β -Induced Spatial Memory Impairment, Hippocampal Apoptosis and MAPKs Signaling Disruption». *Neuropharmacology* 85 (October): 113-20.

Gibbs, M. E., Anderson, D. G. and Hertz, L. 2006. «Inhibition of Glycogenolysis in Astrocytes Interrupts Memory Consolidation in Young Chickens». *Glia* 54 (3): 214-22.

Gibson, G. E., Jope, R. and Blass, J. P. 1975. «Decreased Synthesis of Acetylcholine Accompanying Impaired Oxidation of Pyruvic Acid in Rat Brain Minces». *The Biochemical Journal* 148 (1): 17-23.

Gil-Bea, F. J., Solas, M., Solomon, A., Mugueta, C., Winblad, B., Kivipelto, M., Ramirez, M. J. and Cedazo-Mínguez, A. 2010. «Insulin Levels Are Decreased in the Cerebrospinal Fluid of Women with Prodromal Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 22 (2): 405-13.

Glenner, G. G. and Wong, C .W. 2012. «Alzheimer's Disease: Initial Report of the Purification and Characterization of a Novel Cerebrovascular Amyloid Protein. 1984». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425 (3): 534-39.

Goedert, M., Spillantini, M. G. and Crowther, R. A. 1991. «Tau Proteins and Neurofibrillary Degeneration». *Brain Pathology* 1 (4): 279-86.

Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J. and Crowther, R. A. 1989. «Cloning and Sequencing of the cDNA Encoding an Isoform of Microtubule-Associated Protein Tau

Containing Four Tandem Repeats: Differential Expression of Tau Protein mRNAs in Human Brain». *The EMBO Journal* 8 (2): 393-99.

Gong, C.X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. 2005. «Post-Translational Modifications of Tau Protein in Alzheimer's Disease». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 112 (6): 813-38.

Gouras, G. K., Almeida, C. G. and Takahashi, R. H. 2005. «Intraneuronal Abeta Accumulation and Origin of Plaques in Alzheimer's Disease». *Neurobiology of Aging* 26 (9): 1235-44.

Grant, S. G., O'Dell, T. J., Karl, K. A., Stein, P. L., Soriano, P., and Kandel, E. R. 1992. «Impaired Long-Term Potentiation, Spatial Learning, and Hippocampal Development in Fyn Mutant Mice». *Science (New York, N.Y.)* 258 (5090): 1903-10.

Greenwood, C. E., and Winocur, G. 2001. «Glucose Treatment Reduces Memory Deficits in Young Adult Rats Fed High-Fat Diets». *Neurobiology of Learning and Memory* 75 (2): 179-89.

Griffin, R. J., Moloney, A., Kelliher, M., Johnston, J. A., Ravid, R., Dockery, P., O'Connor, R. and O'Neill, C. 2005. «Activation of Akt/PKB, Increased Phosphorylation of Akt Substrates and Loss and Altered Distribution of Akt and PTEN Are Features of Alzheimer's Disease Pathology». *Journal of Neurochemistry* 93 (1): 105-17.

Grillo, C. A., Piroli, G. G., Wood, G. E., Reznikov, L. R., McEwen, B. S. and Reagan, L. P. 2005. «Immunocytochemical Analysis of Synaptic Proteins Provides New Insights into Diabetes-Mediated Plasticity in the Rat Hippocampus». *Neuroscience* 136 (2): 477-86.

Gruetter, R. 2003. «Glycogen: The Forgotten Cerebral Energy Store». *Journal of Neuroscience Research* 74 (2): 179-83.

Grundman, M., Dibernardo, A., Raghavan, Krams, M. and Yuen, E. 2013. «2012: A Watershed Year for Alzheimer's Disease Research». *The Journal of Nutrition, Health &*

Aging 17 (1): 51-53.

Gustafson, D. 2006. «Adiposity Indices and Dementia». *The Lancet. Neurology* 5 (8): 713-20.

Guzmán, M, and Blázquez C. 2001. «Is There an Astrocyte-Neuron Ketone Body Shuttle?». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 12 (4): 169-73.

Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., and Teplow, D. B. 1992. «Amyloid Beta-Peptide Is Produced by Cultured Cells during Normal Metabolism». *Nature* 359 (6393): 322-25.

Hallschmid, M., Benedict, C., Schultes, B., Born, J. and Kern, W. 2008. «Obese Men Respond to Cognitive but Not to Catabolic Brain Insulin Signaling». *International Journal of Obesity* 32 (2): 275-82.

Hama, E., and Saido, T. C. 2005. «Etiology of Sporadic Alzheimer's Disease: Somatostatin, Neprilysin, and Amyloid Beta Peptide». *Medical Hypotheses* 65 (3): 498-500.

Hardy, J., Cowburn, R., Barton, A., Reynolds, G., Lofdahl, E., O'Carroll, A. M., Wester, P., and Winblad, B. 1987. «Region-Specific Loss of Glutamate Innervation in Alzheimer's Disease». *Neuroscience Letters* 73 (1): 77-80.

Hardy, J. 2006. «A Hundred Years of Alzheimer's Disease Research». *Neuron* 52 (1): 3-13.

Hardy, J. and Selkoe, D. J. 2002. «The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics». *Science* 297 (5580): 353-56.

Harold, D., Abraham, R. Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M .L., Pahwa, J. S. et al. 2009. «Genome-Wide Association Study Identifies Variants at CLU and PICALM Associated with Alzheimer's Disease». *Nature Genetics* 41 (10): 1088-93.

Hartman, A. L., Gasior, M., Vining, E. P. G., and Rogawski, M. A. 2007. «The Neuropharmacology of the Ketogenic Diet». *Pediatric Neurology* 36 (5): 281-92.

Harwood, D. G., Kalechstein, A., Barker, W. W., Strauman, S., George-Hyslop, P., Iglesias,

C., Loewenstein, D. and Duara, R. 2010. «The Effect of Alcohol and Tobacco Consumption, and Apolipoprotein E Genotype, on the Age of Onset in Alzheimer's Disease». *International Journal of Geriatric Psychiatry* 25 (5): 511-18.

Havrankova, J., Roth, J. and Brownstein, M. 1978b. «Insulin Receptors Are Widely Distributed in the Central Nervous System of the Rat». *Nature* 272 (5656): 827-29.

Havrankova, J., Roth, J. and Brownstein, M. J. 1979. «Concentrations of Insulin and Insulin Receptors in the Brain Are Independent of Peripheral Insulin Levels. Studies of Obese and Streptozotocin-Treated Rodents». *The Journal of Clinical Investigation* 64 (2): 636-42.

Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J., and Brownstein, M. 1978a. «Identification of Insulin in Rat Brain». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (11): 5737-41.

Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A. and Evans, D. A. 2013. «Alzheimer Disease in the United States (2010-2050) Estimated Using the 2010 Census». *Neurology* 80 (19): 1778-83.

Heidenreich, K. A., Zahniser, N. R., Berhanu, P., Brandenburg, D., and Olefsky, J. M. 1983. «Structural Differences between Insulin Receptors in the Brain and Peripheral Target Tissues». *The Journal of Biological Chemistry* 258 (14): 8527-30.

Helkala, E. L., Niskanen, L., Viinamaki, H., Partanen, J. and Uusitupa, M. 1995. «Short-Term and Long-Term Memory in Elderly Patients with NIDDM». *Diabetes Care* 18 (5): 681-85.

Hemming, M. L., Patterson, M., Reske-Nielsen, C., Lin, L., Isacson, O., and Selkoe, D. J. 2007. «Reducing Amyloid Plaque Burden via Ex Vivo Gene Delivery of an Abeta-Degrading Protease: A Novel Therapeutic Approach to Alzheimer Disease». *PLoS Medicine* 4 (8): e262.

Heneka, M. T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., Dewachter, I., Walter, J., Klockgether, T. and Van Leuven, F. 2005. «Focal Glial Activation Coincides with Increased BACE1 Activation and Precedes Amyloid Plaque Deposition in APP[V717I] Transgenic Mice».

Journal of Neuroinflammation 2 (October): 22.

Herzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Giros, B., Gaspar, P. and El Mestikawy, S. 2004. «Localization of VGLUT3, the Vesicular Glutamate Transporter Type 3, in the Rat Brain». *Neuroscience* 123 (4): 983-1002.

Herzog, E., Takamori, S., Jahn, R., Brose, N. and Wojcik, S M. 2006. «Synaptic and Vesicular Co-Localization of the Glutamate Transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the Mouse Hippocampus». *Journal of Neurochemistry* 99 (3): 1011-18.

Heverin, M., Maioli, S., Pham, T., Mateos, L., Camporesi, E., Ali, Z., Winblad, B., Cedazo-Minguez, A. and Björkhem, I. 2015. «27-Hydroxycholesterol Mediates Negative Effects of Dietary Cholesterol on Cognition in Mice». *Behavioural Brain Research* 278 (February): 356-59.

Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorell, A., Müller-Tillmanns, B., Lemke, U. et al. 2003. «Antibodies against Beta-Amyloid Slow Cognitive Decline in Alzheimer's Disease». *Neuron* 38 (4): 547-54.

Hoffman, L. B., Schmeidler, J., Lesser, G. T., Beerli, M. S., Purohit, D. P., Grossman, H. T., and Haroutunian, V. 2009. «Less Alzheimer Disease Neuropathology in Medicated Hypertensive than Nonhypertensive Persons». *Neurology* 72 (20): 1720-26.

Ho, L., Qin, W., Pompl, P. N., Xiang, Z., Wang, J., Zhao, Z., Peng, Y., et al. 2004. «Diet-Induced Insulin Resistance Promotes Amyloidosis in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (7): 902-4.

Hoyer, S. 1998. «Risk Factors for Alzheimer's Disease during Aging. Impacts of Glucose/energy Metabolism». *Journal of Neural Transmission*. 54: 187-94.

Hoyer, S. 2002. «The Brain Insulin Signal Transduction System and Sporadic (type II) Alzheimer Disease: An Update». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*

109 (3): 341-60.

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S. and Malinow, R. 2006. «AMPA Removal Underlies Abeta-Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss». *Neuron* 52 (5): 831-43.

Huang, C. C., Lee, C. C. and Hsu, K. S. 2004. «An Investigation into Signal Transduction Mechanisms Involved in Insulin-Induced Long-Term Depression in the CA1 Region of the Hippocampus». *Journal of Neurochemistry* 89 (1): 217-31.

Huang, W. Qiu, C., Winblad, B. and Fratiglioni, L. 2002. «Alcohol Consumption and Incidence of Dementia in a Community Sample Aged 75 Years and Older». *Journal of Clinical Epidemiology* 55 (10): 959-64.

Huang, Y. 2006. «Apolipoprotein E and Alzheimer Disease». *Neurology* 66 (2): S79-85.

Hu, J., Akama, K. T., Krafft, G. A., Chromy, B. A. and Van Eldik, L. J. 1998. «Amyloid-Beta Peptide Activates Cultured Astrocytes: Morphological Alterations, Cytokine Induction and Nitric Oxide Release». *Brain Research* 785 (2): 195-206.

Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I. 2005. «Pharmacological Approaches of Neurofibrillary Degeneration». *Current Alzheimer Research* 2 (3): 335-41.

Izumi, Y., Yamada, K. A., Matsukawa, M. and Zorumski, C. F. 2003. «Effects of Insulin on Long-Term Potentiation in Hippocampal Slices from Diabetic Rats». *Diabetologia* 46 (7): 1007-12.

Jezová, D., Vidas, M. and Sadlon, J. 1985. «C-Peptide-like Material in Rat Brain: Response to Fasting and Glucose Ingestion». *Endocrinologia Experimentalis* 19 (4): 261-66.

Jin, L. W., Ninomiya, H., Roch, J. M., Schubert, D., Masliah, E., Otero, D. A. and Saitoh, T. 1994. «Peptides Containing the RERMS Sequence of Amyloid beta/A4 Protein Precursor Bind Cell Surface and Promote Neurite Extension». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 14 (9): 5461-70.

Ji, Y. F., Xu, S. M., Zhu, J., Wang, X. X. and Shen, Y. 2011. «Insulin Increases Glutamate Transporter GLT1 in Cultured Astrocytes». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405 (4): 691-96.

Juge, N., Gray, J. A., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., Uneyama, H., Edwards, R. H., Nicoll, R. A. and Moriyama, Y. 2010. «Metabolic Control of Vesicular Glutamate Transport and Release». *Neuron* 68 (1): 99-112.

Kamal, A., Biessels, G. J., Urban, I. J. and Gispen, W. H. 1999. «Hippocampal Synaptic Plasticity in Streptozotocin-Diabetic Rats: Impairment of Long-Term Potentiation and Facilitation of Long-Term Depression». *Neuroscience* 90 (3): 737-45.

Kamal, A., Biessels, G. J., Gispen, W. H. and Ramakers, G. M. J. 2006. «Synaptic Transmission Changes in the Pyramidal Cells of the Hippocampus in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in Rats». *Brain Research* 1073-1074 (febrero): 276-80.

Kaminski, R. M., Rogawski, M. A. and Klitgaard, H. 2014. «The Potential of Antiseizure Drugs and Agents That Act on Novel Molecular Targets as Antiepileptogenic Treatments». *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 11 (2): 385-400.

Karch, C. M., Cruchaga, C. and Goate, A. M. 2014. «Alzheimer's Disease Genetics: From the Bench to the Clinic». *Neuron* 83 (1): 11-26.

Kashani, A., Lepicard, E., Poirel, O., Videau, C., David, J. P., Fallet-Bianco, C., Simon, A. et al. 2008. «Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the Prefrontal Cortex Is Correlated with Cognitive Decline in Alzheimer Disease». *Neurobiology of Aging* 29 (11): 1619-30.

Kelly, A., Maguire, C. and Lynch, M. A. 2000. «Deficits in Nerve Growth Factor Release and Tyrosine Receptor Kinase Phosphorylation Are Associated with Age-Related Impairment in Long-Term Potentiation in the Dentate Gyrus». *Neuroscience* 95 (2): 359-65.

Kern, W., Peters, A., Fruehwald-Schultes, B., Deininger, E., Born, J. and Fehm, H. L. 2001.

«Improving Influence of Insulin on Cognitive Functions in Humans». *Neuroendocrinology* 74 (4): 270-80.

Kew, J. N. C. and **Kemp**, J. A. 2005. «Ionotropic and Metabotropic Glutamate Receptor Structure and Pharmacology». *Psychopharmacology* 179 (1): 4-29.

Kiliaan, A. J., **Arnoldussen**, I. A. C. and **Gustafson**, D. R. 2014. «Adipokines: A Link between Obesity and Dementia?». *The Lancet. Neurology* 13 (9): 913-23.

Kim, B. and **Feldman**, E. L. 2012. «Insulin Resistance in the Nervous System». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 23 (3): 133-41.

King, P., **Kong**, M. F., **Parkin**, H., **MacDonald**, I. A., **Barber**, C. and **Tattersall**, R. B. 1998. «Intravenous Lactate Prevents Cerebral Dysfunction during Hypoglycaemia in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus». *Clinical Science* 94 (2): 157-63.

Kirvell, S. L., **Esiri**, M. and **Francis**, P. T. 2006. «Down-Regulation of Vesicular Glutamate Transporters Precedes Cell Loss and Pathology in Alzheimer's Disease». *Journal of Neurochemistry* 98 (3): 939-50.

Kirvell, S. L., **Elliott**, M. S., **Kalaria**, R. N., **Hortobágyi**, T., **Ballard**, C. G. and **Francis**, P. T. 2010. «Vesicular Glutamate Transporter and Cognition in Stroke: A Case-Control Autopsy Study». *Neurology* 75 (20): 1803-9.

Kivipelto, M., **Ngandu**, T., **Fratiglioni**, L., **Viitanen**, M., **Kåreholt**, I., **Winblad**, B., **Helkala**, E. L., **Tuomilehto**, J., **Soininen**, H. and **Nissinen**, A. 2005. «Obesity and Vascular Risk Factors at Midlife and the Risk of Dementia and Alzheimer Disease». *Archives of Neurology* 62 (10): 1556-60.

Klein, W. L., **Stine**, W. B., and **Teplow**, D. B. 2004. «Small Assemblies of Unmodified Amyloid Beta-Protein Are the Proximate Neurotoxin in Alzheimer's Disease». *Neurobiology of Aging* 25 (5): 569-80.

Knobloch, M., **Konietzko**, U., **Krebs**, D. C. and **Nitsch**, R. M. 2007. «Intracellular Abeta and

Cognitive Deficits Precede Beta-Amyloid Deposition in Transgenic arcAbeta Mice». *Neurobiology of Aging* 28 (9): 1297-1306.

Kopf, S. R., and Baratti, C. M. 1996. «Effects of Posttraining Administration of Glucose on Retention of a Habituation Response in Mice: Participation of a Central Cholinergic Mechanism». *Neurobiology of Learning and Memory* 65 (3): 253-60.

Kurochkin, I. V. and Goto, S. 1994. «Alzheimer's Beta-Amyloid Peptide Specifically Interacts with and Is Degraded by Insulin Degrading Enzyme». *FEBS Letters* 345 (1): 33-37.

LaFerla, F. M., Green, K. N. and Oddo, S. 2007. «Intracellular Amyloid-Beta in Alzheimer's Disease». *Nature Reviews. Neuroscience* 8 (7): 499-509.

Laffel, L. 1999. «Ketone Bodies: A Review of Physiology, Pathophysiology and Application of Monitoring to Diabetes». *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 15 (6): 412-26.

Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. and Fahrenholz, F. 1999. «Constitutive and Regulated Alpha-Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by a Disintegrin Metalloprotease». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7): 3922-27.

Lan, J. Y., Skeberdis, V. A., Jover, T., Grooms, S. Y., Lin, Y., Araneda, R. C., Zheng, X., Bennett, M. V. and Zukin, R. S. 2001. «Protein Kinase C Modulates NMDA Receptor Trafficking and Gating». *Nature Neuroscience* 4 (4): 382-90.

Lannert, H. and Hoyer, S. 1998. «Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin causes long-term diminutions in Learning and Memory abilities and in Cerebral Energy Metabolism in Adult Rats». *Behavioural Neurosciences* 112 (5): 1199-208.

Larrabee, M G. 1995. «Lactate Metabolism and Its Effects on Glucose Metabolism in an Excised Neural Tissue». *Journal of Neurochemistry* 64 (4): 1734-41.

Larson, E. B., Wang, L., Bowen, J. D., McCormick, W. C., Teri, L., Crane, P. and Kukull, W. 2006. «Exercise Is Associated with Reduced Risk for Incident Dementia among Persons

- 65 Years of Age and Older». *Annals of Internal Medicine* 144 (2): 73-81.
- Lee, C. C., Huang, C. C., Wu, M. Y. and Hsu, K. S.** 2005. «Insulin Stimulates Postsynaptic Density-95 Protein Translation via the Phosphoinositide 3-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (18): 18543-50.
- Lee, C. C., Kuo, Y. M., Huang, C. C. and Hsu, K. S.** 2009. «Insulin Rescues Amyloid Beta-Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation». *Neurobiology of Aging* 30 (3): 377-87.
- Leibson, C. L., Rocca, W. A., Hanson, V. A., Cha, R., Kokmen, E., O'Brien, P. C. and Palumbo, P. J.** 1997. «The Risk of Dementia among Persons with Diabetes Mellitus: A Population-Based Cohort Study». *Annals of the New York Academy of Sciences* 826 (September): 422-27.
- Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S. H. et al.** 2001. «Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP». *Science* 293 (5534): 1487-91.
- Li, Q. and Puro, D. G.** 2002. «Diabetes-Induced Dysfunction of the Glutamate Transporter in Retinal Müller Cells». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43 (9): 3109-16.
- Liu, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. and Gong, C. X.** 2011. «Deficient Brain Insulin Signalling Pathway in Alzheimer's Disease and Diabetes». *The Journal of Pathology* 225 (1): 54-62.
- Loitfelder, M., Seiler, S., Schwingenschuh, P. and Schmidt, R.** 2012. «Cerebral Microbleeds: A Review». *Panminerva Medica* 54 (3): 149-60.
- Lopez, O. L., Becker, J. T., Wisniewski, S., Saxton, J., Kaufer, D. I. and DeKosky, S. T.** 2002. «Cholinesterase Inhibitor Treatment Alters the Natural History of Alzheimer's Disease». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 72 (3): 310-14.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W. et al.** 2001.

«Mice Deficient in BACE1, the Alzheimer's Beta-Secretase, Have Normal Phenotype and Abolished Beta-Amyloid Generation». *Nature Neuroscience* 4 (3): 231-32.

Lyoo, I. K., Yoon, S. J., Musen, G., Simonson, D. C., Weinger, K., Bolo, N., Ryan, C. M., Kim, J. E., Renshaw, P. F. and Jacobson, A. M. 2009. «Altered Prefrontal Glutamate-Glutamine-Gamma-Aminobutyric Acid Levels and Relation to Low Cognitive Performance and Depressive Symptoms in Type 1 Diabetes Mellitus». *Archives of General Psychiatry* 66 (8): 878-87.

Magistretti, P. J. and Pellerin, L. 1999. «Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain». *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 14 (octubre): 177-82.

Magistretti, P. J. and Pellerin, L. 1997. «Metabolic Coupling during Activation. A Cellular View». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 413: 161-66.

Ma, L., Wang, J. and Li, Y. 2015. «Insulin Resistance and Cognitive Dysfunction». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 444 (febrero): 18-23.

Mangia, S., Kumar, A. F., Moheet, A. A., Roberts, R. J., Eberly, L. E., Seaquist, E. R. and Tkáč, I. 2013. «Neurochemical Profile of Patients with Type 1 Diabetes Measured by ¹H-MRS at 4 T». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33 (5): 754-59.

Manning, C. A., Ragozzino, M. E., and Gold, P. E. 1993. «Glucose Enhancement of Memory in Patients with Probable Senile Dementia of the Alzheimer's Type». *Neurobiology of Aging* 14 (6): 523-28.

Ma, Q. L., Yang, F., Rosario, E. R., Ubeda, O. J., Beech, W., Gant, D. J., Chen, P. P. et al. 2009. «Beta-Amyloid Oligomers Induce Phosphorylation of Tau and Inactivation of Insulin Receptor Substrate via c-Jun N-Terminal Kinase Signaling: Suppression by Omega-3 Fatty

- Acids and Curcumin». *The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (28): 9078-89.
- Marfaing-Jallat**, P., Portha, B. and Pénicaud, L. 1995. «Altered Conditioned Taste Aversion and Glucose Utilization in Related Brain Nuclei of Diabetic GK Rats». *Brain Research Bulletin* 37 (6): 639-43.
- Martin**, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M. L., Yardin, C. and Terro, F. 2013. «Tau Protein Kinases: Involvement in Alzheimer's Disease». *Ageing Research Reviews* 12 (1): 289-309.
- Massó**, F. J. T. and Jiménez, E. 2014. *La Diabetes en la Práctica Clínica (Book)*. Ed. Médica Panamericana.
- Matsuzaki**, T., Sasaki, K., Tanizaki, Y., Hata, J., Fujimi, K., Matsui, Y., Sekita, A. et al. 2010. «Insulin Resistance Is Associated with the Pathology of Alzheimer Disease: The Hisayama Study». *Neurology* 75 (9): 764-70.
- Maurer**, K., Volk, S. and Gerbaldo, H. 1997. «Auguste D and Alzheimer's Disease». *Lancet* 349 (9064): 1546-49.
- McDermott**, J. R., and Gibson, A. M. 1997. «Degradation of Alzheimer's Beta-Amyloid Protein by Human and Rat Brain Peptidases: Involvement of Insulin-Degrading Enzyme». *Neurochemical Research* 22 (1): 49-56.
- McKenna**, M.C., Gruetter, R., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A. "Energy Metabolism of the brain (en) Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects" 7^a ed., Elsevier Academic Press. (2006) 531-557
- Medeiros**, R., Baglietto-Vargas, D. and LaFerla, F. M. 2011. «The Role of Tau in Alzheimer's Disease and Related Disorders». *CNS Neuroscience & Therapeutics* 17 (5): 514-24.
- Meldrum**, B. S. and Rogawski, M. A. 2007. «Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development». *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental*

NeuroTherapeutics 4 (1): 18-61.

Messier, C. and Gagnon, M. 1996. «Glucose Regulation and Cognitive Functions: Relation to Alzheimer's Disease and Diabetes». *Behavioural Brain Research* 75 (1-2): 1-11.

Meziane, H., Dodart, J. C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M. and Ungerer, A. 1998. «Memory-Enhancing Effects of Secreted Forms of the Beta-Amyloid Precursor Protein in Normal and Amnesic Mice». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (21): 12683-88.

Michikawa, M., and Yanagisawa, K. 1999. «Inhibition of Cholesterol Production but Not of Nonsterol Isoprenoid Products Induces Neuronal Cell Death». *Journal of Neurochemistry* 72 (6): 2278-85.

Mielke, M. M., Vemuri, P. and Rocca, W. A. 2014. «Clinical Epidemiology of Alzheimer's Disease: Assessing Sex and Gender Differences». *Clinical Epidemiology* 6: 37-48.

Miller, B. C., Eckman, E. A., Sambamurti, K., Dobbs, N., Chow, K. M., Eckman, C. B., Hersh, L. B. and Thiele, D. L. 2003. «Amyloid-Beta Peptide Levels in Brain Are Inversely Correlated with Insulysin Activity Levels in Vivo». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (10): 6221-26.

Minkeviciene, R., Ihalainen, J., Malm, T., Matilainen, O., Keksa-Goldsteine, V., Goldsteins, G., Iivonen, H. et al. 2008. «Age-Related Decrease in Stimulated Glutamate Release and Vesicular Glutamate Transporters in APP/PS1 Transgenic and Wild-Type Mice». *Journal of Neurochemistry* 105 (3): 584-94.

Mitanez, D. 2007. «Glucose Regulation in Preterm Newborn Infants». *Hormone Research* 68 (6): 265-71.

Mitew, S., Kirkcaldie, M. T. K., Dickson, T. C. and Vickers, J. C. 2013. «Altered Synapses and Gliotransmission in Alzheimer's Disease and AD Model Mice». *Neurobiology of Aging* 34 (10): 2341-51.

Moechars, D., Weston, M. C., Leo, S., Callaerts-Vegh, Z., Goris, I., Daneels, G., Buist, A. et al. 2006. «Vesicular Glutamate Transporter VGLUT2 Expression Levels Control Quantal Size and Neuropathic Pain». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (46): 12055-66.

Moloney, A. M., Griffin, R. J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R. and O'Neill, O. 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): 224-43.

Moore, T. J., Lione, A. P., Sugden, M. C. and Regen D.M. 1976. «Beta-Hydroxybutyrate Transport in Rat Brain: Developmental and Dietary Modulations». *The American Journal of Physiology* 230 (3): 619-30.

Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K. and Ihara, Y. 1995. «Hyperphosphorylation of Tau in PHF». *Neurobiology of Aging* 16 (3): 365-71; discussion 371-80.

Moro, M. L., Giaccone, G., Lombardi, R., Indaco, A., Uggetti, A., Morbin, M., Saccucci, S. et al. 2012. «APP Mutations in the A β Coding Region Are Associated with Abundant Cerebral Deposition of A β 38». *Acta Neuropathologica* 124 (6): 809-21.

Morris, M. C. and Tangney, C. C. 2014. «Dietary Fat Composition and Dementia Risk». *Neurobiology of Aging* 35 Suppl 2 (September): S59-64.

Morris, N. 2008. «Elevating Blood Glucose Level Increases the Retention of Information from a Public Safety Video». *Biological Psychology* 78 (2): 188-90.

Mudher, A. and Lovestone, S. 2002. «Alzheimer's Disease-Do Tauists and Baptists Finally Shake Hands?». *Trends in Neurosciences* 25 (1): 22-26.

Naito, S. and Ueda, T. 1985. «Characterization of Glutamate Uptake into Synaptic Vesicles». *Journal of Neurochemistry* 44 (1): 99-109.

Nampoothiri, M., Reddy, N. D., John, J., Kumar, N., Nampurath, G. K. and Chamallamudi,

M. R. 2014. «Insulin Blocks Glutamate-Induced Neurotoxicity in Differentiated SH-SY5Y Neuronal Cells». *Behavioural Neurology* 2014: 674164.

Nedergaard, M., Takano, T., and Hansen, A. J. 2002. «Beyond the Role of Glutamate as a Neurotransmitter». *Nature Reviews. Neuroscience* 3 (9): 748-55.

Neill, D. 1995. «Alzheimer's Disease: Maladaptive Synaptoplasticity Hypothesis». *Neurodegeneration: A Journal for Neurodegenerative Disorders, Neuroprotection, and Neuroregeneration* 4 (2): 217-32.

Nelson, T. J., Sun, M. K., Hongpaisan, J. and Alkon, D. L. 2008. «Insulin, PKC Signaling Pathways and Synaptic Remodeling during Memory Storage and Neuronal Repair». *European Journal of Pharmacology* 585 (1): 76-87.

Neumann, K. F., Rojo, L., Navarrete, L. P., Farías, G., Reyes, P. and Maccioni, R. B. 2008. «Insulin Resistance and Alzheimer's Disease: Molecular Links & Clinical Implications». *Current Alzheimer Research* 5 (5): 438-47.

Newman, A. B., Fitzpatrick, A. L., Lopez, O., Jackson, S., Lyketsos, C., Jagust, W., Ives, D., Dekosky, S. T. and Kuller, L. H. 2005. «Dementia and Alzheimer's Disease Incidence in Relationship to Cardiovascular Disease in the Cardiovascular Health Study Cohort». *Journal of the American Geriatrics Society* 53 (7): 1101-7.

Newman, L. A., Korol, D. L. and Gold, P. E. 2011. «Lactate Produced by Glycogenolysis in Astrocytes Regulates Memory Processing». *PloS One* 6 (12): e28427.

Nhan, H. S., Chiang, K. and Koo, E. H. 2015. «The Multifaceted Nature of Amyloid Precursor Protein and Its Proteolytic Fragments: Friends and Foes». *Acta Neuropathologica* 129 (1): 1-19.

Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K. et al. 2005. «Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 by Lithium Correlates with Reduced Tauopathy and Degeneration in Vivo». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

States of America 102 (19): 6990-95.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y. and LaFerla, F. M. 2003. «Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular Abeta and Synaptic Dysfunction». *Neuron* 39 (3): 409-21.

Oddo, S., Vasilevko, V., Caccamo, A., Kitazawa, M., Cribbs, D. H. and LaFerla, F. M. 2006. «Reduction of Soluble Abeta and Tau, but Not Soluble Abeta Alone, Ameliorates Cognitive Decline in Transgenic Mice with Plaques and Tangles». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (51): 39413-23.

Ohara, T., Doi, Y., Ninomiya, T., Hirakawa, Y., Hata, J., Iwaki, T., Kanba, S., and Kiyohara, Y. 2011. «Glucose Tolerance Status and Risk of Dementia in the Community: The Hisayama Study». *Neurology* 77 (12): 1126-34.

Ott, A., Stolk, R. P., van Harskamp, F., Pols, H. A., Hofman, A., and Breteler, M. M. 1999. «Diabetes Mellitus and the Risk of Dementia: The Rotterdam Study». *Neurology* 53 (9): 1937-42.

Panov, A., Orynbayeva, Z., Vavilin, V. and Lyakhovich, V. 2014. «Fatty Acids in Energy Metabolism of the Central Nervous System». *BioMed Research International* 2014: 472459.

Parameshwaran, K., Dhanasekaran, M. and Suppiramaniam, V. 2008. «Amyloid Beta Peptides and Glutamatergic Synaptic Dysregulation». *Experimental Neurology* 210 (1): 7-13.

Park, C. R. 2001. «Cognitive Effects of Insulin in the Central Nervous System». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25 (4): 311-23.

Park, C. R., Seeley, R. J., Craft, S. and Woods, S. C. 2000. «Intracerebroventricular Insulin Enhances Memory in a Passive-Avoidance Task». *Physiology & Behavior* 68 (4): 509-14.

Pellerin, L., Stolz, M., Sorg, O., Martin, J. L., Deschepper, C. F. and Magistretti, P. J. 1997. «Regulation of Energy Metabolism by Neurotransmitters in Astrocytes in Primary

Culture and in an Immortalized Cell Line». *Glia* 21 (1): 74-83.

Perez, R. G., Zheng, H., Van der Ploeg, L. H. and Koo, E. H. 1997. «The Beta-Amyloid Precursor Protein of Alzheimer's Disease Enhances Neuron Viability and Modulates Neuronal Polarity». *The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (24): 9407-14.

Perlmutter, L. C., Hakami, M. K., Hodgson-Harrington, C., Ginsberg, J., Katz, J., Singer, D. E. and Nathan, D. M. 1984. «Decreased Cognitive Function in Aging Non-Insulin-Dependent Diabetic Patients». *The American Journal of Medicine* 77 (6): 1043-48.

Peters, A., Schweiger, U., Pellerin, L., Hubold, C., Oltmanns, K. M., Conrad, M., Schultes, B., Born, J., and Fehm, H. L. 2004. «The Selfish Brain: Competition for Energy Resources». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28 (2): 143-80.

Petit, A., Bihel, F., Alvès da Costa, C., Pourquié, O., Checler, F. and Kraus, K. L. 2001. «New Protease Inhibitors Prevent Gamma-Secretase-Mediated Production of Aβ_{40/42} without Affecting Notch Cleavage». *Nature Cell Biology* 3 (5): 507-11.

Pettersen, J. A., and Skelton, R. W. 2013. «Glucose Enhances Long-Term Declarative Memory in Mildly Head-Injured Varsity Rugby Players». *Psychobiology* 28 (1): 81-89.

Pfund, Z., Chugani, D. C., Juhász, C., Muzik, O., Chugani, H. T., Wilds, I. B., Seraji-Bozorgzad, N., and Moore, G. J. 2000. «Evidence for Coupling between Glucose Metabolism and Glutamate Cycling Using FDG PET and 1H Magnetic Resonance Spectroscopy in Patients with Epilepsy». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20 (5): 871-78.

Piazza-Gardner, A. K., Gaffud, T. J. B. and Barry, A. E. 2013. «The Impact of Alcohol on Alzheimer's Disease: A Systematic Review». *Aging & Mental Health* 17 (2): 133-46.

Pollay, M., and Stevens F. A. 1980. «Starvation-Induced Changes in Transport of Ketone Bodies across the Blood-Brain Barrier». *Journal of Neuroscience Research* 5 (2): 163-72.

Popp, J., Meichsner, S., Kölsch, H., Lewczuk, P., Maier, W., Kornhuber, J., Jessen, F., and

Lütjohann, D. 2013. «Cerebral and Extracerebral Cholesterol Metabolism and CSF Markers of Alzheimer's Disease». *Biochemical Pharmacology* 86 (1): 37-42.

Porras, O. H., Loaiza, A. and Barros, L. F. 2004. «Glutamate Mediates Acute Glucose Transport Inhibition in Hippocampal Neurons». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (43): 9669-73.

Powers, W. J., Rosenbaum, J. L., Dence, C. S., Markham, J., and Videen, T. O. 1998. «Cerebral Glucose Transport and Metabolism in Preterm Human Infants». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18 (6): 632-38.

Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., and Ferri, C .P. 2013. «The Global Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Metaanalysis». *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 9 (1): 63-75.e2.

Profenno, L. A., Porsteinsson, A. P. and Stephen V. F. 2010. «Meta-Analysis of Alzheimer's Disease Risk with Obesity, Diabetes, and Related Disorders». *Biological Psychiatry* 67 (6): 505-12.

Qiu, W. Q. and Folstein, M. F. 2006. «Insulin, Insulin-Degrading Enzyme and Amyloid-Beta Peptide in Alzheimer's Disease: Review and Hypothesis». *Neurobiology of Aging* 27 (2): 190-98.

Racchi, M., Porrello, E., Lanni, C., Lenzken, S. C., Mazzucchelli, M. and Govoni, S. 2006. «Role of Acetylcholinesterase Inhibitors in Pharmacological Regulation of Amyloid Precursor Protein Processing». *Aging Clinical and Experimental Research* 18 (2): 149-52.

Rasgon, N. L., Kenna, H. A., Wroolie, T. E., Silverman, R. K. D., Brooks, J., Williams, K. E., Powers, B. N., Hallmayer, J. and Reiss, A. 2011. «Insulin Resistance and Hippocampal Volume in Women at Risk for Alzheimer's Disease». *Neurobiology of Aging* 32 (11): 1942-48.

Rasmussen, P., Wyss, M. T. and Lundby, C. 2011. «Cerebral Glucose and Lactate Consumption during Cerebral Activation by Physical Activity in Humans». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (9): 2865-73.

Reed, M. N., Hofmeister, J. J., Jungbauer, L., Welzel, A. T., Yu, C., Sherman, M. A., Lesné, S. et al. 2011. «Cognitive Effects of Cell-Derived and Synthetically Derived A β Oligomers». *Neurobiology of Aging* 32 (10): 1784-94.

Reger, M. A., Watson, G. S., Green, P. S., Wilkinson, C. W., Baker, L. D., Cholerton, B., Fishel, M. A. et al. 2008. «Intranasal Insulin Improves Cognition and Modulates Beta-Amyloid in Early AD». *Neurology* 70 (6): 440-48.

Reijmer, Y. D., van den Berg, E., Ruis, C., Kappelle, L. J. and Biessels, G. J. 2010. «Cognitive Dysfunction in Patients with Type 2 Diabetes». *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 26 (7): 507-19.

Reiner, P., Jouvent, E., Duchesnay, E., Cuingnet, R., Mangin, J. F., Chabriat, H. and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. 2012. «Sulcal Span in Alzheimer's Disease, Amnesic Mild Cognitive Impairment, and Healthy Controls». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 29 (3): 605-13.

Revett, T. J., Baker, G. B., Jhamandas, J. and Kar., S. 2013. «Glutamate System, Amyloid β Peptides and Tau Protein: Functional Interrelationships and Relevance to Alzheimer Disease Pathology». *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN* 38 (1): 6-23.

Ricobaraza, A., Cuadrado-Tejedor, M., Marco, S., Pérez-Otaño, I. and García-Osta, A. 2012. «Phenylbutyrate Rescues Dendritic Spine Loss Associated with Memory Deficits in a Mouse Model of Alzheimer Disease». *Hippocampus* 22 (5): 1040-50.

Rivera, E. J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J. R. and 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: JAD* 8 (3): 247-68.

Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerrière, A., Vital, A., Dumanchin, C. et al. 2006. «APP Locus Duplication Causes Autosomal Dominant Early-Onset Alzheimer Disease with Cerebral Amyloid Angiopathy». *Nature Genetics* 38 (1): 24-26.

Ruitenbergh, A., van Swieten, J .C., Witteman, J. C. M., Mehta, K. M., van Duijn, C. M., Hofman, A. and M. M. B. Breteler. 2002. «Alcohol Consumption and Risk of Dementia: The Rotterdam Study». *Lancet* 359 (9303): 281-86.

Rulifson, E. J., Kim, S. K. and Nusse, R.. 2002. «Ablation of Insulin-Producing Neurons in Flies: Growth and Diabetic Phenotypes». *Science* 296 (5570): 1118-20.

Rupsingh, R., Borrie, M., Smith, M., Wells, J. L. and Bartha, R. 2011. «Reduced Hippocampal Glutamate in Alzheimer Disease». *Neurobiology of Aging* 32 (5): 802-10.

Rusanen, M., Kivipelto, M., Quesenberry, C. P., Zhou, J. and Whitmer, R. A. 2011. «Heavy Smoking in Midlife and Long-Term Risk of Alzheimer Disease and Vascular Dementia». *Archives of Internal Medicine* 171 (4): 333-39.

Sabayan, B., Foroughinia, F., Mowla, A. and Borhanighighi, A. 2008. «Role of Insulin Metabolism Disturbances in the Development of Alzheimer Disease: Mini Review». *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias* 23 (2): 192-99.

Sandebring, A., Welander, H., Winblad, B., Graff, C. and Tjernberg, L. O. 2013. «The Pathogenic A β 43 Is Enriched in Familial and Sporadic Alzheimer Disease». *PloS One* 8 (2): e55847.

Santos, M. S., Pereira, E. M. and Carvahó, A. P. 1999. «Stimulation of Immunoreactive Insulin Release by Glucose in Rat Brain Synaptosomes». *Neurochemical Research* 24 (1): 33-36.

Sapolsky, R. M. 2000. «The Possibility of Neurotoxicity in the Hippocampus in Major Depression: A Primer on Neuron Death». *Biological Psychiatry* 48 (8): 755-65.

Schechter, R., Whitmire, J., Wheet, G. S., Beju, D., Jackson, K. W., Harlow, R. and Gavin, J. R. 1994. «Immunohistochemical and in Situ Hybridization Study of an Insulin-like Substance in Fetal Neuron Cell Cultures». *Brain Research* 636 (1): 9-27.

Scheff, S. W. and Price, D. A. 2006. «Alzheimer's Disease-Related Alterations in Synaptic Density: Neocortex and Hippocampus». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 9 (3 Suppl): 101-15.

Schellenberg, G. D. and Montine, T. J. 2012. «The Genetics and Neuropathology of Alzheimer's Disease». *Acta Neuropathologica* 124 (3): 305-23.

Schneider, L. S., Mangialasche, F., Andreasen, N., Feldman, H., Giacobini, E., Jones, R., Mantua, V. et al. 2014. «Clinical Trials and Late-Stage Drug Development for Alzheimer's Disease: An Appraisal from 1984 to 2014». *Journal of Internal Medicine* 275 (3): 251-83.

Schousboe, A., Westergaard, N., Waagepetersen, H. S., Larsson, O. M., Bakken, I. J., and Sonnewald, U. 1997. «Trafficking between Glia and Neurons of TCA Cycle Intermediates and Related Metabolites». *Glia* 21 (1): 99-105.

Schrijvers, E. M. C., Witteman, J. C. M., Sijbrands, E. J. G., Hofman, A., Koudstaal, P. J. and Breteler, M. M. B.. 2010. «Insulin Metabolism and the Risk of Alzheimer Disease: The Rotterdam Study». *Neurology* 75 (22): 1982-87.

Schubert, M., Gautam, D., Surjo, D., Ueki, K., Baudler, S., Schubert, D., Kondo, T. et al. 2004. «Role for Neuronal Insulin Resistance in Neurodegenerative Diseases». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (9): 3100-3105.

Schurr, A., Miller, J. J., Payne, R. S. and Rigor, B. M. 1999. «An Increase in Lactate Output by Brain Tissue Serves to Meet the Energy Needs of Glutamate-Activated Neurons». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (1): 34-39.

- Schwartz**, M. W., Figlewicz, D. F., Kahn, S. E, Baskin, D. G., Greenwood, M. R. and Porte, D. 1990. «Insulin Binding to Brain Capillaries Is Reduced in Genetically Obese, Hyperinsulinemic Zucker Rats». *Peptides* 11 (3): 467-72.
- Seal**, R. P., Akil, O., Yi, E., Weber, C. M., Grant, L., Yoo, J., Clause, A. et al. 2008. «Sensorineural Deafness and Seizures in Mice Lacking Vesicular Glutamate Transporter 3». *Neuron* 57 (2): 263-75.
- Selkoe**, D. J. 2004. «Cell Biology of Protein Misfolding: The Examples of Alzheimer's and Parkinson's Diseases». *Nature Cell Biology* 6 (11): 1054-61.
- Selkoe**, D. J. 1997. «Images in Neuroscience. Alzheimer's Disease: From Genes to Pathogenesis». *The American Journal of Psychiatry* 154 (9): 1198.
- Serenó**, L., Coma, M., Rodríguez, M., Sánchez-Ferrer, P., Sánchez, M. B., Gich, I., Agulló, J. M. et al. 2009. «A Novel GSK-3beta Inhibitor Reduces Alzheimer's Pathology and Rescues Neuronal Loss in Vivo». *Neurobiology of Disease* 35 (3): 359-67.
- Serrano-Pozo**, A., Frosch, M. P., Masliah, E. and Hyman. B. T. 2011. «Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1 (1): 6189.
- Shivers**, B. D., Hilbich, C., Multhaup, G., Salbaum, M., Beyreuther, K., and Seeburg, P. H. 1988. «Alzheimer's Disease Amyloidogenic Glycoprotein: Expression Pattern in Rat Brain Suggests a Role in Cell Contact». *The EMBO Journal* 7 (5): 1365-70.
- Shoelson**, S. E., Lee, J. and Goldfine, A. B. 2006. «Inflammation and Insulin Resistance». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (7): 1793-1801.
- Siegel**, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K. and Uhler, M. D. 1999. «Basic Neurochemistry».
- Siemers**, E., Skinner, M., Dean, R. A., Gonzales, C., Satterwhite, J., Martin, F., Ness, D. and May, P. C. 2005. «Safety, Tolerability, and Changes in Amyloid Beta Concentrations after Administration of a Gamma-Secretase Inhibitor in Volunteers». *Clinical Neuropharmacology*

28 (3): 126-32.

Siesjo, B. K. Utilisation of substrates by brain. (en) Brain energy metabolism. New York: Wiley (1978) 101-130

Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A. and Feldman, E. L. 2010. «How Does Diabetes Accelerate Alzheimer Disease Pathology?». *Nature Reviews. Neurology* 6 (10): 551-59.

Skeberdis, V. A., Lan, J., Zheng, X., Zukin, R. S and Bennett, M. V. 2001. «Insulin Promotes Rapid Delivery of N-Methyl-D- Aspartate Receptors to the Cell Surface by Exocytosis». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (6): 3561-66.

Smith, A. D. 2002. «Imaging the Progression of Alzheimer Pathology through the Brain». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7): 4135-37.

Smith, M. A., Riby, L. M., van Eekelen, J. A. M. and Foster, J. K. 2011. «Glucose Enhancement of Human Memory: A Comprehensive Research Review of the Glucose Memory Facilitation Effect». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35 (3): 770-83.

Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Nairn, A .C et al. 2005. «Regulation of NMDA Receptor Trafficking by Amyloid-Beta». *Nature Neuroscience* 8 (8): 1051-58.

Snyder, J. S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J. and Cameron, H. A. 2011. «Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behavior». *Nature* 476 (7361): 458-61.

Soderling, T. R. and Derkach, V. A. 2000. «Postsynaptic Protein Phosphorylation and LTP». *Trends in Neurosciences* 23 (2): 75-80.

Sokoloff L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M. H., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O., Shinohara M. "The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local

cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat." *J. Neurochem.* 28 (1977) 897-916

Solas, M., Aisa, B., Mugueta, M.C., Del Río, J., Tordera, R. M. and Ramírez, M. J. 2010. «Interactions between Age, Stress and Insulin on Cognition: Implications for Alzheimer's Disease». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35 (8): 1664-73.

Sondag, C. M., Dhawan, G. and Combs, C. K. 2009. «Beta Amyloid Oligomers and Fibrils Stimulate Differential Activation of Primary Microglia». *Journal of Neuroinflammation* 6: 12.

Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Xu, R. T., Xu, J., Wands, K. R. and 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: JAD* 7 (1): 63-80.

Stöhr, O., Schilbach, K., Moll, L., Hettich, M. M., Freude, S., Wunderlich, T., Ernst, M. et al. 2013. «Insulin Receptor Signaling Mediates APP Processing and B-Amyloid Accumulation without Altering Survival in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease». *Age (Dordrecht, Netherlands)* 35 (1): 83-101.

Strachan, M. W., Deary, I. J., Ewing, F. M. and Frier, B. M. 1997. «Is Type II Diabetes Associated with an Increased Risk of Cognitive Dysfunction? A Critical Review of Published Studies». *Diabetes Care* 20 (3): 438-45.

Stratmann, M., Konrad, S., Kugel, H., Krug, A., Schöning, S., Ohrmann, P., Uhlmann, C. et al. 2014. «Insular and Hippocampal Gray Matter Volume Reductions in Patients with Major Depressive Disorder». *PloS One* 9 (7): e102692.

Stroud, J. C., Liu, C., Teng, P. K. and Eisenberg, D. 2012. «Toxic Fibrillar Oligomers of Amyloid-B Have Cross-B Structure». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (20): 7717-22.

Tabernerro, A., Vicario, C. and Medina, J. M. 1996. «Lactate Spares Glucose as a Metabolic Fuel in Neurons and Astrocytes from Primary Culture». *Neuroscience Research* 26 (4): 369-76.

Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., and Jahn, R.. 2000. «Identification of a Vesicular Glutamate Transporter That Defines a Glutamatergic Phenotype in Neurons». *Nature* 407 (6801): 189-94.

Talbot, K., Wang, H. Y., Kazi, H., Han, L- Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., Fuino, R. L. et al. 2012. «Demonstrated Brain Insulin Resistance in Alzheimer's Disease Patients Is Associated with IGF-1 Resistance, IRS-1 Dysregulation, and Cognitive Decline». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (4): 1316-38.

Tan, Z. S., Beiser, A. S., Fox, C. S., Au, R., Himali, J. J., Debette, S., Decarli, C., Vasan, R. S., Wolf, P. A. and Seshadri, S. 2011. «Association of Metabolic Dysregulation with Volumetric Brain Magnetic Resonance Imaging and Cognitive Markers of Subclinical Brain Aging in Middle-Aged Adults: The Framingham Offspring Study». *Diabetes Care* 34 (8): 1766-70.

Tenreiro, S., Eckermann, K. and Outeiro, T. F. 2014. «Protein Phosphorylation in Neurodegeneration: Friend or Foe?». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7: 42.

Terry, A. V. and Buccafusco, J. J.. 2003. «The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306 (3): 821-27.

Thal, D. R., Griffin, W. S. T. and Braak, H. 2008. «Parenchymal and Vascular Abeta-Deposition and Its Effects on the Degeneration of Neurons and Cognition in Alzheimer's Disease». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12 (5B): 1848-62.

Timmer, N. M., Metaxas, A., van der Stelt, I., Kluijtmans, L. A. J., van Berckel, B. N. and

Verbeek, M. M. 2014. «Cerebral Level of vGlut1 Is Increased and Level of Glycine Is Decreased in TgSwDI Mice». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 39 (1): 89-101.

Tordera, R. M., Totterdell, S., Wojcik, S. M., Brose, N., Elizalde N., Lasheras, B. and Del Rio, J. 2007. «Enhanced Anxiety, Depressive-like Behaviour and Impaired Recognition Memory in Mice with Reduced Expression of the Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGLUT1)». *The European Journal of Neuroscience* 25 (1): 281-90.

Trudeau, F., Gagnon, S. and Massicotte, G. 2004. «Hippocampal Synaptic Plasticity and Glutamate Receptor Regulation: Influences of Diabetes Mellitus». *European Journal of Pharmacology* 490 (1-3): 177-86.

Unger, J., McNeill, T. H., Moxley, R. T., White, M., Moss, A. and Livingston, J. N. 1989. «Distribution of Insulin Receptor-like Immunoreactivity in the Rat Forebrain». *Neuroscience* 31 (1): 143-57.

Unger, J. W., Livingston, J. N. and Moss, A. M. 1991. «Insulin Receptors in the Central Nervous System: Localization, Signalling Mechanisms and Functional Aspects». *Progress in Neurobiology* 36 (5): 343-62.

Vaishnavi, S. N., Vlassenko, A. G., Rundle, M. M., Snyder, A. Z., Mintun, M. A. and Raichle, M. E. 2010. «Regional Aerobic Glycolysis in the Human Brain». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (41): 17757-62.

Valastro, B., Cossette, J., Lavoie, N., Gagnon, S., Trudeau, F., and Massicotte, G. 2002. «Up-Regulation of Glutamate Receptors Is Associated with LTP Defects in the Early Stages of Diabetes Mellitus». *Diabetologia* 45 (5): 642-50.

Van der Heide, L. P., Kamal, A., Artola, A., Gispen, W. H. and Ramakers, G. M. J. 2005. «Insulin Modulates Hippocampal Activity-Dependent Synaptic Plasticity in a N-Methyl-D-Aspartate Receptor and Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Dependent Manner». *Journal of Neurochemistry* 94 (4): 1158-66.

Vanhanen, M., Kuusisto, J., Koivisto, K., Mykkänen, L., Helkala, E. L., Hänninen, T., Riekkinen, P., Soininen, H. and Laakso, M. 1999. «Type-2 Diabetes and Cognitive Function in a Non-Demented Population». *Acta Neurologica Scandinavica* 100 (2): 97-101.

Varady, K. A., and Jones, P. J. H. 2005. «Combination Diet and Exercise Interventions for the Treatment of Dyslipidemia: An Effective Preliminary Strategy to Lower Cholesterol Levels?». *The Journal of Nutrition* 135 (8): 1829-35.

Varoqui, H., Schäfer, M. K. H., Zhu, H., Weihe, E. and Erickson, J. D. 2002. «Identification of the Differentiation-Associated Na⁺/PI Transporter as a Novel Vesicular Glutamate Transporter Expressed in a Distinct Set of Glutamatergic Synapses». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (1): 142-55.

Vekrellis, K., Ye, Z., Qiu, W. Q., Walsh, D., Hartley, D., Chesneau, V., Rosner, M. R. and Selkoe, D. J. 2000. «Neurons Regulate Extracellular Levels of Amyloid Beta-Protein via Proteolysis by Insulin-Degrading Enzyme». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (5): 1657-65.

Veneman, T., Mitrakou, A., Mookan, M., Cryer, P., and Gerich, J. 1994. «Effect of Hyperketonemia and Hyperlacticacidemia on Symptoms, Cognitive Dysfunction, and Counterregulatory Hormone Responses during Hypoglycemia in Normal Humans». *Diabetes* 43 (11): 1311-17.

Vest, R. S., and Pike, C. J. 2013. «Gender, Sex Steroid Hormones, and Alzheimer's Disease». *Hormones and Behavior* 63 (2): 301-7.

Vining, E. P. 1999. «Clinical Efficacy of the Ketogenic Diet». *Epilepsy Research* 37 (3): 181-90.

Vogels, O. J., Broere, C. A., ter Laak, H. J., ten Donkelaar, H. J., Nieuwenhuys, R. and Schulte, B. P. 1990. «Cell Loss and Shrinkage in the Nucleus Basalis Meynert Complex in Alzheimer's Disease». *Neurobiology of Aging* 11 (1): 3-13.

Wallum, B. J., Taborsky, G. J., Porte, D., Figlewicz, D. P., Jacobson, L., Beard, J. C., Ward, W. K. and Dorsa, D. 1987. «Cerebrospinal Fluid Insulin Levels Increase during Intravenous Insulin Infusions in Man». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 64 (1): 190-94.

Walsh, D. M., Klyubin, M.I., Fadeeva, Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J. and Selkoe, D. J. 2002. «Naturally Secreted Oligomers of Amyloid Beta Protein Potently Inhibit Hippocampal Long-Term Potentiation in Vivo». *Nature* 416 (6880): 535-39.

Walsh, D. M., and Selkoe, D. J. 2004a. «Oligomers on the Brain: The Emerging Role of Soluble Protein Aggregates in Neurodegeneration». *Protein and Peptide Letters* 11 (3): 213-28.

Walsh, D. M., and Selkoe, D. J. 2004b. «Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease». *Neuron* 44 (1): 181-93.

Watson, G. S., Baker, L. D., Cholerton, B. A., Rhoads, K. W., Merriam, G. R., Schellenberg, G. D., Asthana, S., Cherrier, M. and Craft, S. 2009. «Effects of Insulin and Octreotide on Memory and Growth Hormone in Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 18 (3): 595-602.

Watson, G. S., Cholerton, B.A., Reger, M. A., Baker, L. D., Plymate, S. R., Asthana, S., Fishel, M. A. et al. 2005. «Preserved Cognition in Patients with Early Alzheimer Disease and Amnestic Mild Cognitive Impairment during Treatment with Rosiglitazone: A Preliminary Study». *The American Journal of Geriatric Psychiatry: Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 13 (11): 950-58.

Welander, H., Frånberg, J., Graff, C., Sundström, E., Winblad, B. and Tjernberg, L. O. 2009. «Aβ₄₃ Is More Frequent than Aβ₄₀ in Amyloid Plaque Cores from Alzheimer Disease Brains». *Journal of Neurochemistry* 110 (2): 697-706.

Wenk, G. L., Parsons, C. G. and Danysz, W. 2006. «Potential Role of N-Methyl-D-

Aspartate Receptors as Executors of Neurodegeneration Resulting from Diverse Insults: Focus on Memantine». *Behavioural Pharmacology* 17 (5-6): 411-24.

Williams, J. 1997. «How Does a Vesicle Know It Is Full?». *Neuron* 18 (5): 683-86.

Wilson, Nathan R., Jiansheng Kang, Emily V. Hueske, Tony Leung, Helene Varoqui, Jonathan G. Murnick, Jeffrey D. Erickson, y Guosong Liu. 2005. «Presynaptic Regulation of Quantal Size by the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (26): 6221-34.

Wiltfang, J., Esselmann, H., Mirko., Hüll, M., Hampel, H., Kessler, H., Frölich, L. et al. 2007. «Amyloid Beta Peptide Ratio 42/40 but Not A Beta 42 Correlates with Phospho-Tau in Patients with Low- and High-CSF A Beta 40 Load». *Journal of Neurochemistry* 101 (4): 1053-59.

Wirhth, O., Multhaup., G. and Bayer, T. A. 2004. «A Modified Beta-Amyloid Hypothesis: Intraneuronal Accumulation of the Beta-Amyloid Peptide--the First Step of a Fatal Cascade». *Journal of Neurochemistry* 91 (3): 513-20.

Wozniak, M., Rydzewski, B., Baker, Raizada, M. K. 1993. "The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system". *Neurochemistry. Int* 22:1-10

Wojcik, S. M., Rhee, J. S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N. and Rosenmund, C. 2004. «An Essential Role for Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGLUT1) in Postnatal Development and Control of Quantal Size». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (18): 7158-63.

Wolfe, M. S. 2008. «Inhibition and Modulation of Gamma-Secretase for Alzheimer's Disease». *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 5 (3): 391-98.

«**World Alzheimer Report 2014:** Dementia and Risk Reduction | Alzheimer's Disease International». 2015. <http://www.alz.co.uk/research/world-report-2014>.

- Xu, W., Qiu, C., Winblad, B. and Fratiglioni, L.** 2007. «The Effect of Borderline Diabetes on the Risk of Dementia and Alzheimer's Disease». *Diabetes* 56 (1): 211-16.
- Yamazaki, T., Koo, E. H. and Selkoe, D. J.** 1996. «Trafficking of Cell-Surface Amyloid Beta-Protein Precursor. II. Endocytosis, Recycling and Lysosomal Targeting Detected by Immunolocalization». *Journal of Cell Science* 109 (May): 999-1008.
- Yang, Y., Ma, D., Wang, Y., Jiang, T., Hu, S., Zhang, M., Yu, X. and Gong, C. X.** 2013. «Intranasal Insulin Ameliorates Tau Hyperphosphorylation in a Rat Model of Type 2 Diabetes». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 33 (2): 329-38.
- Yang, Z. Z., Tschopp, O., Baudry, A., Dümmler, B., Hynx, D. and Hemmings B. A.** 2004. «Physiological Functions of Protein Kinase B/Akt». *Biochemical Society Transactions* 32 (Pt 2): 350-54.
- Zahniser, N. R., Goens, M. B., Hanaway, P. J. and Vinych, J. V.** 1984. «Characterization and Regulation of Insulin Receptors in Rat Brain». *Journal of Neurochemistry* 42 (5): 1354-62.
- Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E. and Mandelkow, E. M.** 2010. «Aβ Oligomers Cause Localized Ca²⁺ Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (36): 11938-50.
- Zhang, Y., Kuang, Y., Xu, K., Harris, D., Lee, Z., LaManna, J. and Puchowicz, M.A.** 2013. «Ketosis Proportionately Spares Glucose Utilization in Brain». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33 (8): 1307-11.
- Zhao, L., Teter, B., Morihara, T., Lim, G. P., Ambegaokar, S. S., Ubeda, O.J., Frautschy, S. A. and Cole, G. M.** 2004. «Insulin-Degrading Enzyme as a Downstream Target of Insulin Receptor Signaling Cascade: Implications for Alzheimer's Disease Intervention». *The Journal*

of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 24 (49): 11120-26.

Zhao, W. Q., and Townsend, M. 2009. «Insulin Resistance and Amyloidogenesis as Common Molecular Foundation for Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1792 (5): 482-96.

Zhao, W. Q., and Alkon, D. L. 2001. «Role of Insulin and Insulin Receptor in Learning and Memory». *Molecular and Cellular Endocrinology* 177 (1-2): 125-34.

Zielke, H. R., Zielke, C. L. and Baab, P. J. 2009. «Direct Measurement of Oxidative Metabolism in the Living Brain by Microdialysis: A Review». *Journal of Neurochemistry* 109 Suppl 1 (May): 24-29.

Zupec-Kania, B.A and Spellman, E. 2008. «An Overview of the Ketogenic Diet for Pediatric Epilepsy». *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* 23 (6): 589-96.

CAPÍTULO II
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las cotas epidémicas que están alcanzando las enfermedades neurodegenerativas y especialmente la enfermedad de Alzheimer (EA), en nuestra sociedad suponen una emergencia de salud pública y un impacto social de gran trascendencia. Otro tipo de patologías como la obesidad, diabetes, hiperlipidemia y síndrome metabólico asumen tasas de incidencia y prevalencia mundial sin precedentes, con un gran impacto sobre la salud pública. Éstas enfermedades se posicionan entre los factores de riesgo ambientales más importantes para el desarrollo de la EA. Por lo tanto, es de gran importancia identificar mecanismos patogénicos nuevos y comunes entre la EA y sus factores de riesgo. La insulino-resistencia como proceso fundamental patogénico puede subyacer a todos ellos. Y así, diversos estudios epidemiológicos muestran una clara asociación entre insulino-resistencia, declive en la memoria y mayor riesgo de desarrollar EA. De hecho, la EA se ha llegado a describir como “diabetes tipo 3”. Sin embargo, a día de hoy aún no se conocen con exactitud los mecanismos etiológicos por los cuales alteraciones en la señalización y respuesta a insulina puede conducir al desarrollo de EA.

Con la edad, tanto en humanos como en animales se ha descrito una progresiva tendencia a desarrollar una insulino-resistencia no solamente a nivel periférico, sino que se ha descrito que a nivel central los efectos de una baja respuesta a la insulina podrían provocar una serie de eventos neuronales en hipocampo que pudieran en consecuencia afectar a la memoria. Las alteraciones a la respuesta a insulina podrían cambiar la producción eficiente de energía cerebral impulsada por la glucosa a una producción menos eficiente impulsada por los cuerpos cetónicos.

Recientemente se ha descubierto que los cuerpos cetónicos, actuando sobre transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT), ejercen un papel inhibitorio en la liberación de glutamato. En la EA se ha descrito un déficit glutamatérgico, así como un transporte de glutamato reducido tanto en la membrana como en las vesículas sinápticas. Con

el avance de la EA hay un progresivo déficit glutamatérgico neuronal, una progresiva inflamación y una pérdida de plasticidad sináptica.

A la vista de estos antecedentes, la hipótesis principal del presente trabajo es investigar si deficiencias periféricas en la señalización de insulina pudieran cambiar el metabolismo para producir cuerpos cetónicos, lo que a su vez, en el hipocampo, podría conducir a una disminución de la expresión de VGLUT1, y por lo tanto a una menor liberación de glutamato.

Los objetivos concretos de este trabajo son:

1. Comprobar las alteraciones en la señalización de insulina en la EA.

1.1 Estudio de la señalización de insulina en cerebros humanos post-mortem. El desarrollo de este punto queda reflejado en el capítulo 3. Se evaluará la señalización intracelular de la insulina, mediante la determinación de los niveles del receptor de insulina y de sus marcadores de señalización Akt y ERK.

1.2 Análisis del efecto de la insulino-resistencia periférica inducido por dieta sobre la señalización de insulina a nivel central. El desarrollo de este punto queda reflejado en el capítulo 4. Se evaluará el estado cognitivo (mediante el test de reconocimiento de nuevo objeto, NORT), el desarrollo de resistencia a insulina periférica (mediante la determinación de los niveles de insulina, glucosa e índice HOMA plasmáticos), la producción periférica de cuerpos cetónicos, la resistencia a insulina central (mediante la determinación de la señalización intracelular de insulina a través de receptor de insulina, sustrato de receptor de insulina tipo 1 (IRS1) y Akt), así como los niveles de cuerpos cetónicos cerebrales.

1.3 Investigación de los posibles mecanismos causantes de las alteraciones en la señalización de insulina en la EA: papel de la quinasa JNK. El desarrollo de este

punto queda reflejado en el capítulo 3. Se evaluarán los niveles de la quinasa pJNK en cerebros post-mortem de EA. Además se estudiarán los efectos funcionales y bioquímicos de su inhibición mediante la administración de un inhibidor específico (D-JNKi).

2. Estudiar si las alteraciones en la señalización de insulina centrales están asociadas al deterioro glutamatérgico en la EA.

2.1 Expresión de VGLUT1 en cerebros post-mortem humanos y en el modelo experimentales de insulino-resistencia inducido por dieta. El desarrollo de este punto queda reflejado en los capítulos 3 y 4.

2.2 Efecto de una expresión reducida de VGLUT1 en la liberación de glutamato. El desarrollo de este punto queda reflejado en el capítulo 4.

3. Estudiar la relación entre resistencia a la insulina, A β y expresión de VGLUT1.

3.1. Analizar el efecto del péptido β -amiloide sobre la expresión de VGLUT1 tanto *in vitro* (cultivos primarios) como *in vivo* (cerebros post-mortem y modelos animales de EA) y estudiar su correlación con el estado cognitivo. El desarrollo de este punto queda reflejado en el capítulo 5.

3.2. Influencia de las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica sobre otros mecanismos deletéreos en la EA. El desarrollo de este punto queda reflejado en el capítulo 5. Se analizará el efecto de la administración de oligómeros de A β en un modelo transgénico en el que la neurotransmisión glutamatérgica está disminuida (administración intracerebroventricular de A β en animales VGLUT1+/-), en el

desarrollo de mecanismos patológicos involucrados en la EA, como la alteración de la plasticidad sináptica o neuroinflamación.

- 4. Investigar el efecto del ácido lipoico, un tratamiento capaz de revertir o prevenir la resistencia a la insulina sobre la transmisión glutamatérgica.** El desarrollo de este punto queda reflejado en el capítulo 4. Para llevar a cabo este objetivo se han estudiado los efectos funcionales y bioquímicos de la administración de ácido lipóico a los animales sometidos a una dieta alta en grasa.

CAPÍTULO III

Chapter 3

JNK: bridging the insulin signalling and VGLUT1 in Alzheimer's disease

Abstract

In addition to deficits in several neurotransmitter systems, alterations in cerebral metabolic homeostasis is one of the most relevant characteristics of sporadic Alzheimer's disease (AD). It has been studied here the involvement of C-Jun N-terminal kinase (JNK) in alterations in brain insulin signaling and glutamatergic deficits in AD. In postmortem cortical brain tissues from AD patients, pJNK levels were increased, while insulin signalling was decreased, as shown by decreased mRNA insulin receptor (IR) levels and downstream signalling pathways (i.e. pAKT and pERK2). The expression of vesicular glutamate transporter1 (VGLUT1), a marker of glutamatergic terminals, was decreased and a significant correlation was found between a reduced expression of insulin receptor and VGLUT1. In an animal model of insulin resistance, the administration of D-JNKi1, a JNK inhibitor, not only reversed central insulin resistance, but also counteracted the decreased VGLUT1 expression. It could be suggested that activation of JNK in AD inhibits insulin signaling which in turn, leads to a decreased expression of VGLUT1, therefore contributing to the glutamatergic deficit in AD.

Key words: JNK, insulin, glutamate, post-mortem human tissue, insulin signalling, pAkt

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a devastating illness due to the social and personal impact that causes in the daily life of millions of patients, relatives and caregivers. The concept of dysfunctional insulin signalling in sporadic Alzheimer's disease (AD) is now widely accepted and diabetes is recognized as one of the main risk factors for developing AD. Epidemiological and biological evidences suggest the existence of a physiopathological link between alteration in insulin signalling and AD. Early stages of AD are marked by metabolic dysfunction associated with altered brain insulin signalling and significant abnormalities in insulin-regulated gene expression and kinase activation. Postmortem AD brains showed decreased insulin and receptor activities in proportion to the severity of disease (Steen et al. 2005; Talbot et al. 2012).

The initial components of the insulin receptor signalling cascade in the brain are largely similar to those of the periphery, but the downstream targets of the cascade are quite different, probably involving, among others, the glutamatergic system (Viswaprakash et al. 2015). Glutamate is the principal excitatory amino acid neurotransmitter in the mammalian brain, and it is involved in most aspects of higher mental function, including learning and memory and. An essential step in glutamate neurotransmission is the concentration of glutamate into synaptic vesicles by vesicular glutamate transporters (VGLUTs) before release from the presynaptic terminal, and in fact, VGLUT1 is considered as a marker of glutamatergic terminals. Some lines of evidence indicated that the decreased VGLUT1 expression in frontal regions of AD patients is strongly correlated with the progression of cognitive decline in AD (Kirvell et al. 2010).

c-Jun N-terminal kinases (JNKs), as member of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family, is a central stress signaling pathways implicated in gene expression, neuronal plasticity, regeneration, cell death and regulation of cellular senescence. It has been shown activation of JNK pathway after exposure to different stressing factors including cytokines, oxidative stress, Unfolded Protein Response (UPR) signals or A β peptides. JNK may also directly induce insulin resistance, as JNK phosphorylates IRS1 at an inhibitory site that can block signal transduction by the insulin receptor (Boura-Halfon et al. 2009).

The hypothesis of the present work is that activation of JNK in AD might inhibit insulin signaling which in turn, might lead to a decreased expression of VGLUT1 and therefore, to the glutamatergic deficit described in AD.

2. Methods

2.1. Patients and tissue samples

Brain tissues were obtained from the Oxford Project to Investigate Memory and Ageing (OPTIMA, see <http://www.medsci.ox.ac.uk/optima>). Subjects for this study constituted a randomly selected subset of the participants, now part of the Thomas Willis Oxford Brain Collection within the Brains for Dementia Research Initiative (BDR). Subjects had been assessed annually with the Mini-Mental State Examination (MMSE). Complete medication histories were recorded and none of the subjects was treated with cholinomimetics. The study had Local Ethics Committees' approval. At autopsy, brains were removed and blocks corresponding to frontal (Brodmann area 10, BA10) cortex were dissected. All subjects were staged at Braak V / VI (AD) or 0-II (Controls) as assessed by a neuropathologist (Hope et al. 1992).

2.2. Animal model of insulin resistance

All the experiments were carried out in strict compliance with the recommendations of the EU (DOCE L 358/1 18/2/1986) for the care and use of laboratory animals. Male mice (C57BL/6J), 3 months old, were used. The following experimental groups have been used (n=9 mice per group): saline, corticosterone, JNK inhibitor D-JNKi, corticosterone+D-JNKi. In the corticosterone groups, mice received drinking water supplemented with 100 µg/ml corticosterone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 4 weeks. D-JNKi (0,3 mg/kg; Enzo Life Sciences, New York, USA) was dissolved in saline and administered (i.p.) once a day during the corticosterone treatment period (Solas et al. 2013).

2.3. Biochemical measurements

2.3.1. Insulin receptor mRNA levels. Total mRNA was extracted according to the instructions of NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany). DNAase treatment was performed with DNA-free kit (Ambion, TX, USA), and purified total RNA used as a template to generate first-strand cDNA synthesis using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA) as described by the manufacturer. Quantitative real-time PCR was performed as described by the provider (Applied Biosystems, CA, USA) using an ABI PRISM 7000 HT Sequence Detection System. Taqman probes were supplied by Applied Biosystems (CA, USA). IR mRNA expression levels were normalized using GAPDH as internal control. Fold change between different groups of brains were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

2.3.2. *Western blotting.* Hippocampal tissues were homogenized in 10 volumes of lysis buffer containing (mmol/L): 50 Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 % Nonidet P-40, 1:100 of phosphatases and proteases inhibitors cocktail set II (Calbiochem, Darmstadt, Germany). Proteins (10 µg for VGLUT and 50 µg for (p)Akt, (p)JNK or (p)ERK2) were separated by electrophoresis on a SDS-polyacrylamide gel (7,5%) and detected using the following antibodies: anti-pAkt Ser 473 and total Akt (1:1000, Cell Signalling Technology), anti-p42/p44 MAPK (ERK1/2) and total ERK1/2 (1:1000, Cell Signalling Technology) and anti-VGLUT1 (1:2000, donated by Dr. S. El Mestikawy, Paris, France) and anti-pSAPK/JNK and total SAPK/JNK (1:1000, Cell Signalling Technology, Beverly, MA. USA). Immunopositive bands were visualized using an enhanced chemiluminescence western blotting-detection reagent (ECL; Amersham, Buckinghamshire, England). The optical density (O.D.) of reactive bands visible on X-ray film was determined densitometrically. β -actin was used as internal control. Results were expressed as percentage of O.D. values.

2.4. Data analysis.

Data were analyzed by SPSS for Windows, release 15.0 and normality was checked by Shapiro-Wilks's test ($p < 0.05$). Data was analysed by two-way ANOVA or Student's t-test. Correlation studies between variables were studied by Pearson's correlation coefficient.

3. Results

3.1. Demographical details

The total number of cases analyzed was 15 controls (7 males/8 females) and 16 AD (6 males/10 females). Age at death was 73 ± 3 years (controls) and 81 ± 2 (AD cases). There were no significant differences between controls and AD regarding post-mortem delay (40.1 ± 6.4 h in controls vs 49.8 ± 7.4 h in AD) or brain pH (6.6 ± 0.1 vs 6.4 ± 0.1 Student's t-test $p > 0.05$, in all cases).

3.2. Alterations in insulin signalling in AD could be associated to JNK activation

In AD frontal cortex, levels of IR mRNA (1.58 ± 0.22 vs 0.90 ± 0.17 , Student's t-test; $p < 0.01$), and markers of downstream signaling pathways (pAkt and pERK2, Student's t-test $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively, Figure 1a and b) were significantly decreased versus control. There was a significant positive correlation between pAkt or pERK2 levels and cognitive deficits in AD, as shown by MMSE score (Pearson's, $r = 0.596$; $p < 0.01$; and Pearson's, $r = 0.875$; $p < 0.01$, respectively). In AD samples, pJNK levels were significantly increased (Student's t-test; $p < 0.001$, Figure 1c). There was a very strong trend towards a significant negative correlations in AD between a IR mRNA levels and pJNK expression (Pearson's, $r = -0.522$; $p = 0.06$; $n = 16$)

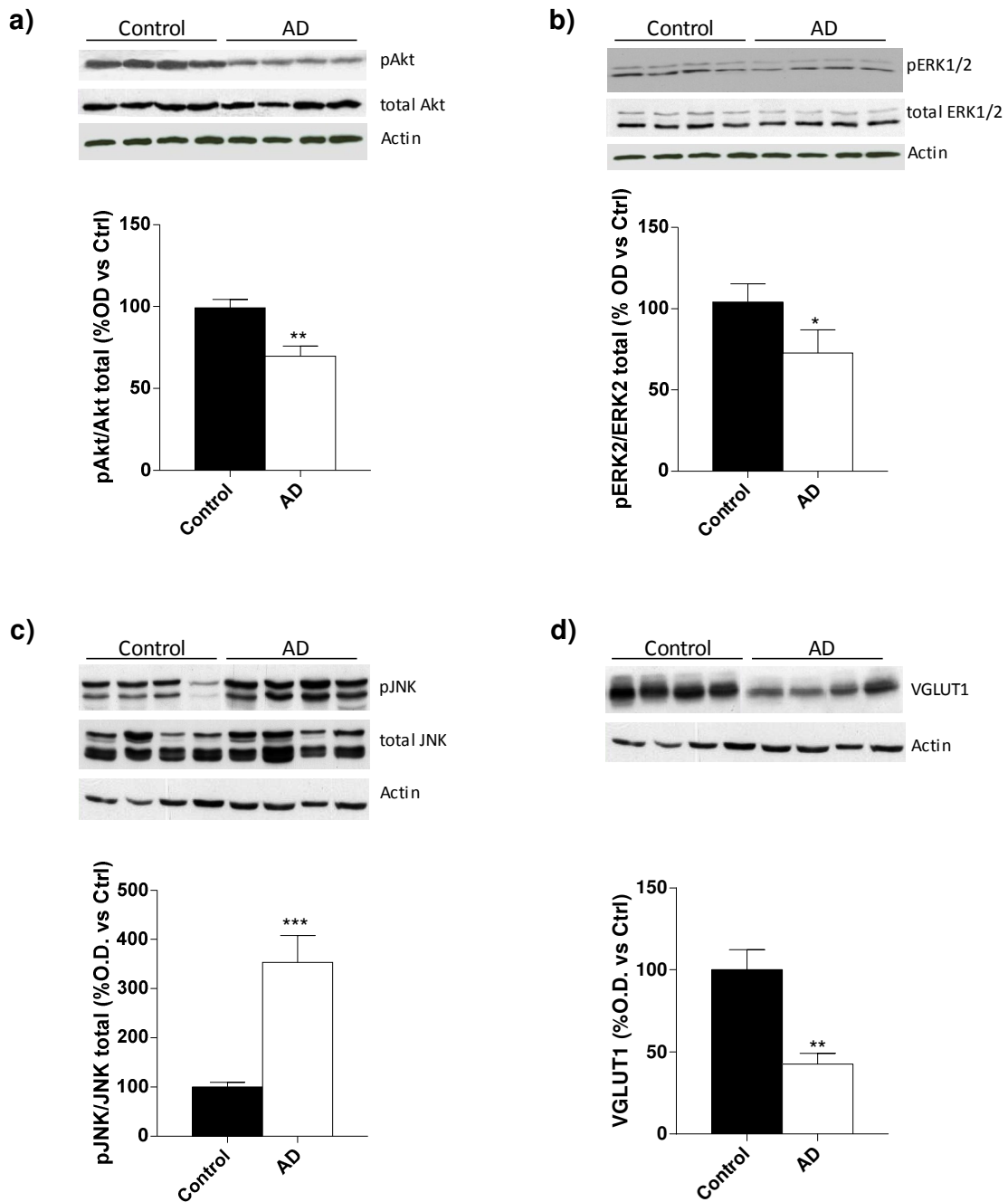


Figure 1. Insulin signaling pathways pAkt (a) and pERK2 (b), pJNK (c) and VGLUT1 (d) expression in control and AD frontal cortex (BA10). In each panel, a representative picture of western blot is shown. Results are expressed as % optical density (O.D.) of controls and normalized to total levels of protein (a, b, c and d) and β -actin is used as internal control or normalized to β -actin (d). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3.3. Insulin resistance and glutamatergic alterations in AD

In AD, as depicted in Figure 1d, VGLUT1 expression was reduced (Student's t-test; $p < 0.01$), and a significant positive correlation was observed between IR mRNA levels and VGLUT1 expression (Pearson's, $r = 0.729$; $p < 0.01$; $n = 16$).

3.4. Effects of JNK inhibition in an animal model of central insulin resistance.

As previously reported, corticosterone treatment led to cognitive deficits, increased pJNK expression and central insulin resistance, as decreased levels of insulin receptor phosphorylation, the phosphorylation status of the adapter protein insulin receptor substrate 1 (IRS1) at the active site (Ser636/639) and downstream signaling markers (pAkt and pERK) were observed. Interestingly, all these effects were reversed by treatment with D-JNKi (Solas et al. 2013). Using this same cohort of animals, it was presently found that corticosterone treatment induced a significant decrease in hippocampal VGLUT1 levels [$F_{3,35} = 4.105$, $p < 0.05$] that was reversed by D-JNKi1 (Figure 2).

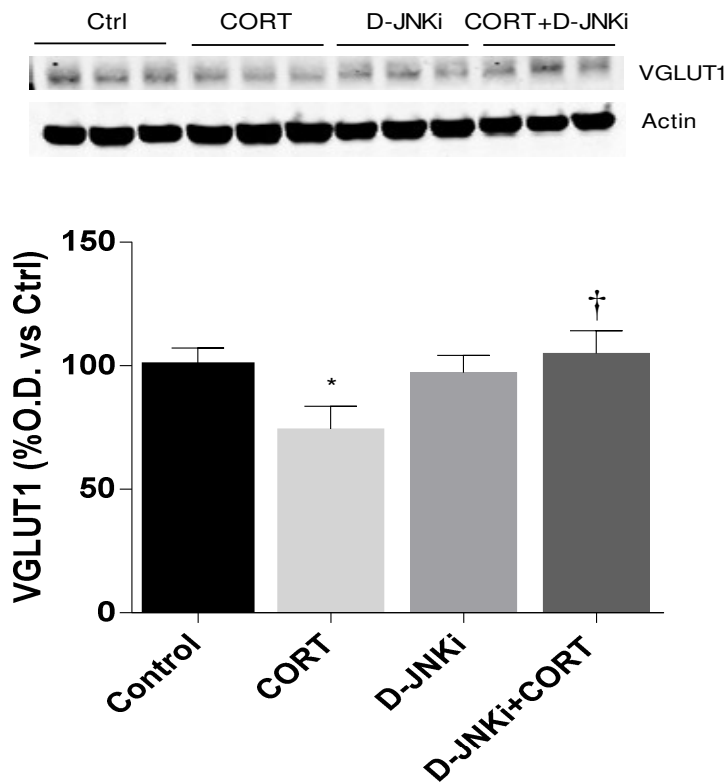


Figure 2. Effect of a chronic treatment with JNKi on corticosterone-induced decreases in VGLUT1 expression. Panels show percentage of optical density (O.D.) values of control mice and representative picture of the blotting. Two-way ANOVA, * $p < 0.05$ to controls, † $p < 0.05$ to corticosterone-treated group. CORT: corticosterone.

4. Discussion

The present work corroborates the finding that postmortem AD brain shows signs of altered insulin signaling, including reduced brain IR expression downstream pathways activity. It is accepted that increased accumulation of A β oligomers and their binding to synapses lead to removal of IRs from the neuronal plasma membrane (De Felice, 2013). Altered IR downstream pathways could be related to cognitive deficits in AD (presently demonstrated), as activation of the insulin signal transduction cascade (PI3K/Akt/ERK) is required for the induction of long-term potentiation, basic process underlying learning and memory (Sui et al. 2008). Activation of JNK might be

related to alterations in insulin pathways in AD insulin resistance through inhibition of IRS-1 (De Felice, 2013), and suppression of the JNK pathway has been shown to improve insulin resistance and glucose tolerance (Li et al. 2013). Supporting this idea, it has been shown that the administration of a JNK inhibitor reverses insulin resistance and cognitive deficits in a model of chronic corticosterone administration (Solas et al. 2013).

Impairments in insulin signalling might lead to deficits in energy metabolism with associated increases in oxidative stress, proinflammatory cytokine activation and mitochondrial bioenergetics dysfunction and increased APP expression (Steen et al. 2005; de la Monte et al. 2006; de la Monte, 2012). Collectively, this results in a shift in brain metabolic profile from glucose-driven bioenergetics towards a compensatory, but less efficient, ketogenic pathway that seems to occur in early AD (Yao et al. 2011). Interestingly, it has been suggested that excessive ketone bodies levels regulates VGLUTs activity and can block release of glutamate from VGLUTs (Juge et al. 2010). Therefore, it is possible to speculate that deficiencies in insulin signaling could switch neuronal metabolism to produce ketone bodies, which in turn, might lead to a decreased expression of VGLUT1, and therefore to a decreased release of glutamate and hence, to the glutamatergic deficit described in AD. Inhibition of JNK, by reversing insulin alterations, has presently proven to reverse also glutamatergic deficiencies, supporting our hypothesis that JNK may serve as a crucial link between metabolic diseases and glutamatergic deficits.

Overall, the results of the present project could help not only to a better understanding of the common mechanisms that could link and underlie both to diabetes

and AD, but also to consider new therapeutic options. In a research field still awaiting substantial progress in therapeutic options, the idea of AD as a brain type of diabetes mellitus is now being translated into clinical trials with promising early results and it is considered nowadays that effective management of diabetes might prevent or delay the onset of AD. Modulation of VGLUT1 activity through modulating pJNK may be considered as a possible therapeutic target for the treatment of metabolic disturbances in AD

Acknowledgments

MRP is a recipient of a fellowship from FIS. This work has been supported by a grant from FIS (13/00858).

References

- Boura-Halfon**, S. and Zick, Y. 2009. «Phosphorylation of IRS Proteins, Insulin Action, and Insulin Resistance». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 296 (4): E581-91.
- De Felice**, F. G. 2013. «Alzheimer's Disease and Insulin Resistance: Translating Basic Science into Clinical Applications». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (2): 531-39.
- De la Monte**, S. M. 2012. «Brain Insulin Resistance and Deficiency as Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease». *Current Alzheimer Research* 9 (1): 35-66.
- 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». *Journal of Alzheimer's Disease*: 9 (2): 167-81.
- Hope**, T., and Fairburn, C.G. 1992. «The Present Behavioural Examination (PBE): The Development of an Interview to Measure Current Behavioural Abnormalities». *Psychological Medicine* 22 (1): 223-30.
- Juge**, N., Gray, J. A., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., Uneyama, H., Edwards, R. H., Nicoll, R. A. and Moriyama, Y. 2010. «Metabolic Control of Vesicular Glutamate Transport and Release». *Neuron* 68 (1): 99-112.
- Kirvell**, S. L., Elliott, M. S., Kalaria, R. N., Hortobágyi, T., Ballard, C. G. and Francis, P. T. 2010. «Vesicular Glutamate Transporter and Cognition in Stroke: A Case-Control Autopsy Study». *Neurology* 75 (20): 1803-9.
- Li**, H. and Yu, X. 2013. «Emerging Role of JNK in Insulin Resistance». *Current Diabetes Reviews* 9 (5): 422-28.
- Solas**, M., Gerenu, G., Gil-Bea, F. J. and Ramírez, M. J. 2013. «Mineralocorticoid Receptor Activation Induces Insulin Resistance through c-Jun N-Terminal Kinases in Response to

Chronic Corticosterone: Cognitive Implications». *Journal of Neuroendocrinology* 25 (4): 350-56.

Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Xu, R. T., Xu, J., Wands, K. R. and 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: JAD* 7 (1): 63-80.

Sui, L., Wang, J. and Li, B-M. 2008. «Role of the Phosphoinositide 3-Kinase-Akt-Mammalian Target of the Rapamycin Signaling Pathway in Long-Term Potentiation and Trace Fear Conditioning Memory in Rat Medial Prefrontal Cortex». *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 15 (10): 762-76.

Talbot, K., Wang, H. Y., Kazi, H., Han, L- Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., Fuino, R. L. et al. 2012. «Demonstrated Brain Insulin Resistance in Alzheimer's Disease Patients Is Associated with IGF-1 Resistance, IRS-1 Dysregulation, and Cognitive Decline». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (4): 1316-38.

Viswaprakash, N., Vaithianathan, T., Viswaprakash, A., Parameshwaran, R. J. K. and Suppiramaniam, V. 2015. «Insulin Treatment Restores Glutamate (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isioxazolepropionic Acid) Receptor Function in the Hippocampus of Diabetic Rats». *Journal of Neuroscience Research*, March.

Yao, J., Rettberg, J. R., Klosinski, L. P., Cadenas, E. and Brinton, R. D. 2011. «Shift in Brain Metabolism in Late Onset Alzheimer's Disease: Implications for Biomarkers and Therapeutic Interventions». *Molecular Aspects of Medicine* 32 (4-6): 247-57.

CAPÍTULO IV

Chapter 4

Lipoic acid improves neuronal insulin signaling and rescues cognitive function regulating VGlut1 expression in high-fat-fed rats: implications for Alzheimer's disease

Abstract

It is hypothesized here that ketosis associated to insulin resistance could interfere with the normal activity of VGLUT1 and its role in the release of glutamate in the hippocampus, which might ultimately lead to an increased vulnerability for cognitive deficits in pathologies associated to insulin resistance, such as Alzheimer's disease (AD). The present work demonstrated that high fat diet (HFD) rats showed memory impairments and both peripheral (as shown by increased fasting plasma insulin levels and HOMA index) and hippocampal (as shown by decreased activation of insulin receptor, IRS-1 and pAkt) insulin pathway alterations, accompanied by increased ketone bodies production. All these effects were counteracted by α -lipoic acid (LA) administration. VGLUT1 levels were significantly decreased in the hippocampus of HFD rats, and this decrease was reversed by LA. In neuronal primary cell culture, increasing concentrations of the ketone body 3- β -hydroxybutyrate lead to a concentration dependent glutamate release reduction. Altogether, the present results suggest that HFD induced insulin resistance could switch metabolism to produce ketone bodies, which in turn, in the hippocampus, might lead to a decreased expression of VGLUT1, and therefore to a decreased release of glutamate and hence, to the glutamatergic deficit described in AD. The ability of LA treatment to prevent insulin resistance in this model of HFD might represent a possible new therapeutic target for the treatment of AD.

Key words: high-fat-diet; insulin resistance; ketone bodies; Alzheimer's disease; cognitive deficits; VGLUT1; glutamate

1. Introduction

Global obesity is a pandemic status, estimated to affect over 2 billion people, that has resulted in an enormous strain on healthcare systems worldwide. The situation is compounded by the fact that apart from the direct costs associated with overweight pathology, obesity presents itself a number of comorbidities, including diabetes mellitus type 2, insulin resistance, and an increased risk for the development of neurodegenerative disorders. Alzheimer's disease (AD) is a devastating illness due to the social and personal impact that causes in the daily life of millions of patients, relatives and caregivers. The concept of central insulin resistance and dysfunctional insulin signalling in sporadic AD is now widely accepted and diabetes is recognized as one of the main risk factors for developing AD. Epidemiological and biological evidences suggest the existence of a physiopathological link between alteration in insulin signalling and AD (Qiu et al. 2006; Barbagallo et al. 2014). Early stages of AD are marked by deficits in cerebral glucose utilization (Caselli et al. 2008; Mosconi et al. 2006; Mosconi et al. 2008; Langbaum et al. 2010) and, as the disease progresses, the metabolic abnormalities worsen (Hoyer et al. 1991). Postmortem AD brains showed decreased insulin and receptor activities in proportion to the severity of disease (Rivera et al. 2005; Steen et al. 2005; Talbot et al. 2012; Ma et al. 2015). This hypothesis is further strengthened by a recent study of diabetes-related genes in the brains of post-mortem AD patients and in a mouse model of AD (Hokama et al. 2014). However, the precise mechanism by which insulin resistance can exacerbate these neurodegenerative processes remains unclear.

The initial components of the insulin receptor signalling cascade in the brain are largely similar to those of the periphery, but the downstream targets of the cascade are quite different, probably involving, among others, the glutamatergic system (Zheng et al. 2009). Glutamate is the principal excitatory amino acid neurotransmitter in the mammalian brain, responsible for basal excitatory synaptic transmission and many forms of synaptic plasticity such as long term potentiation and long term depression associated with cognitive processes and is involved in most aspects of higher mental function, including learning and memory and perception (Fonnum, 1984; McEntee et al. 1993; Danbolt, 2001). An essential step in glutamate neurotransmission is the concentration of glutamate into synaptic vesicles before releasing from the presynaptic terminal by vesicular glutamate transporters (VGLUTs), and in fact, VGLUT1 is considered as a marker of glutamatergic terminals (Fremeau et al. 2004; Wojcik et al. 2004). Some lines of evidence indicated that VGLUT1 are impaired in frontal regions of AD patients (Mitew et al. 2013) and this impairment is strongly correlated with the progression of cognitive decline in AD (Kashani et al. 2008). The identification of ketone bodies as physiological modulators of VGLUTs (Juge et al. 2010) has opened the path for novel approach to associate insulin-resistance to an altered glutamatergic function. Impairments in insulin signalling lead to deficits in energy metabolism with concomitant increases in oxidative stress, proinflammatory cytokine activation and mitochondrial dysfunction. Collectively, this results in a shift in the brain metabolic profile from glucose-driven bioenergetics towards a compensatory, but less efficient, ketogenic pathway (Yao et al. 2011). It has been described that increased ketone bodies levels regulates VGLUTs activity and can block release of glutamate from VGLUTs (Juge et al. 2010).

α -lipoic acid (5-(1,2-dithiolan-3-yl)-pentanoic acid) (LA) is a natural occurring compound that is present in several animal and vegetal nutritional sources, including liver and kidney, spinach, broccoli and tomato, brussel sprouts and rice bran. LA has antioxidant properties and it is an important cofactor for mitochondrial enzymes (Fernández-Galilea et al. 2015). Several studies have suggested anti-obesity, insulin-sensitizing and anti-steatotic properties of this molecule (Kim et al. 2004; Prieto-Hontoria et al. 2009; Prieto-Hontoria et al. 2011; Valdecantos et al. 2012a; Valdecantos et al. 2012b; Prieto-Hontoria et al. 2013; Fernández-Galilea et al. 2014; Fernández-Galilea et al. 2015).

The hypothesis of the present work is that diet-induced deficiencies in insulin signaling could switch metabolism to produce ketone bodies, which in turn, in the hippocampus, might lead to a decreased expression of VGLUT1, and therefore to a decreased release of glutamate. Following this hypothesis, treatments able to reverse or prevent insulin resistance, such LA, could represent a new option for the treatment of central nervous system pathologies associated to an altered glutamatergic function. To this end it has been studied the functional and biochemical effects of administering LA to high-fat diet (HFD) rats, a well-established experimental approach to induce insulin resistance in peripheral organs of rodents.

2. Methods

2.1. Animal and diets

All the experiments were carried out in strict compliance with the recommendations of the EU (DOCE L 358/1 18/2/1986) for the care and use of laboratory animals, the National and Institutional Guidelines for Animal Care and Use

with the approval of the Ethical Committee for Animal Care and Use at the University of Navarra. Six-week-old male Wistar rats were obtained from the Centre of Applied Pharmacology (CIFA, Pamplona, Spain). Animals were housed in polycarbonate cages (3–4 rats per cage) in a temperature-controlled room ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) with a 12 h light–dark cycle. Rats were assigned to two dietary groups: 1) Animals ($n=12$) receiving normal chow standard diet (Harlan Tekland Global Diets) containing 20 % of energy as proteins, 67 % as carbohydrates, and 13 % as lipids per dry weight; 2) Animals ($n=24$) receiving a high-fat diet (HFD, OpenSource diets Research Diets Inc) containing 60 % of energy as lipids, 20 % as carbohydrates, and 20 % as proteins per dry weight, which has been widely used to induce obesity in rodents (Prieto-Hontoria et al. 2011). Half of the animals of the HFD group were supplemented with racemic α -Lipoic acid (LA, Sigma, St Louis, MO) in a proportion of 0.25 g LA/100 g of diet. LA was thoroughly and homogeneously mixed with the diet using a blender. At the end of the experimental period (56 days), behavioral studies (novel object recognition test and locomotor activity) were performed for two days after which rats were killed by decapitation, after 12 h fasting.

2.1.1. Tissue and blood collection

Overnight fasting rats were killed by decapitation between 08.00-10.00 h am. Brains were removed and dissected on ice to obtain the hippocampus and stored at -80°C . Trunk blood was collected into tubes, centrifuged at 1250 g (15 min, 4°C), and serum was frozen.

2.2. Behavioral studies

2.2.1. Locomotor activity

Horizontal locomotor activity was measured for 30 min in an open field, which consisted of nine square arenas (43x51x45 cm³) made of black wood, using a video tracking system (Ethovision 3.0, Noldus Information Technology B.V., The Netherlands), in a softly illuminated room. Tracking system was set to determine the position of the animal five times per second. Total path length (cm) was analyzed.

2.2.2. Object Recognition

The novel object recognition (NOR) task is a method to measure a specific form of recognition memory. It is based on the spontaneous behaviour of rodents and offers the advantage of not needing external motivation, reward or punishment. The NOR test has been increasingly used as an experimental tool in AD to assess drug effects on memory or to investigate the neural mechanisms underlying learning and memory (Bengoetxea et al. 2015). The arena consisted of a square arena (65 cm×65 cm×45 cm) made of black wood. On the previous day to the experiment, animals were familiarized with the field during 30 min. During the first trial of the experiment, two objects identical in shape, size, color, texture..., equidistant from the sides (10 cm) were placed within the chamber. The animal was placed into the centre of the open-field and allowed to freely explore for 5 min. It was considered that the animal was exploring the object when the head of the rat was oriented toward the object with its nose within 2 cm of the object. One hour later a second trial took place, in which one object was replaced by a different one, and exploration was scored for 5 min. In order to eliminate olfactory stimuli, chamber and objects were cleaned after testing each animal. To avoid preference for one of the objects, the order of the objects was balance between testing

animals. Results were expressed as percentage of time spent with the novel object with respect to the total exploration time (discrimination index).

2.3. Neuronal primary cell culture

Neuronal primary culture experiments were carried out using C57BL/6J mice embryos. Hippocampal and cortex tissues from 19-day-old wild type (WT) mice embryos were homogenized in serum-free NeuroBasal medium with 2% B27 supplement (Invitrogen, CA, USA). Cells were seeded in dishes that were pre-coated with poly-D-lysine (0.17 mg/ml, Sigma-Aldrich, MO, USA) in PBS. Cells were grown for 15 days and then were treated with increasing concentrations of 3- β -hydroxybutyrate (1 μ M, 10 μ M, 1 mM and 5 mM) (Sigma-Aldrich, MO, USA), dissolved in gassed Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB) made up of (mmol/l): NaCl, 113; KCl, 4,75; CaCl₂, 2,52; MgSO₄, 1,19; NaH₂PO₄, 1,18; NaHCO₃, 25; glucose, 10; pH, 7,4. After 30 minutes cells were collected to assess released glutamate levels in the medium.

2.4. Biochemical measurements

2.4.1. Plasma determinations

Serum insulin levels were measured by ELISA for rat Insulin ELISA kit (Linco, St. Charles, MI, USA). Serum glucose levels were assayed using Glucose GOD-PAP enzyme immunoassay Kit in a Cobas Mira Autoanalyzer (Roche Diagnostic, Basel, Swiss), insulin sensitivity was analysed by assessing the homeostatic model assessment (HOMA) index (Ribot et al. 2008; Flanagan et al. 2008). HOMA index is expressed as insulin (μ U/mL) x glucose (mg/dL)/405. β -hydroxybutyrate levels were measured using the auto analyzer PENTRA C200 (HORIBA medical, Madrid, Spain) (Huerta et al. 2015).

2.4.2. Hippocampal levels of 3- β -hydroxybutyrate

Fresh rat hippocampal tissues were homogenized in 10 volumes of lysis buffer containing: 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, Nonidet P-40, 2 mM oxalic acid, 1:1000 of phosphatases and proteases inhibitors cocktail set II (Calbiochem, Darmstadt, Germany). After sonication, samples were centrifuged at 12,000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant was collected to measure 3- β -hydroxybutyrate using a commercial kit (Ranbut; Randox, UK) according to manufacturer's instructions. Protein determination was performed by Bradford method (Bio-Rad protein Assay, Hercules, CA).

2.4.3. Glutamate levels

Glutamate released from cell cultures was measured using high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection (Waters Spheribor 5 μ ODS2 4,6x150 mm) including precolumn derivatization with ophthalaldehyde (Sigma-Aldrich Ltd, Germany) and β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Ltd, Germany). The mobile phase consisted of 72:28 (v/v) mixture of buffer NaH₂PO₄ 0.1 M, pH 5.5) and methanol; the mixture was filtered and degassed through a 0.22 mm nitrocellulose membrane (Millipore, UK). Glutamate content was calculated by comparing with a 2 ng standard. The detection limit was 20 pg/10 ml for glutamate content.

2.4.4. Western blotting

For vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1), pIR, total IR, pIRS1, total IRS1, pAkt and total Akt determinations, hippocampal tissues were homogenized in 10 volumes of lysis buffer containing (mmol/L): 50 Tris-HCl (pH 8), 150 NaCl, 2 EGTA, Nonidet P-40, 1:100 of phosphatases and proteases inhibitors cocktail set II (Calbiochem, Darmstadt, Germany). Proteins (10 μ g for VGLUT and 50 μ g for the rest of proteins) were separated by electrophoresis on a SDS-polyacrylamide gel (7,5%) and detected using the following antibodies: anti-VGLUT1 (1:2000, donated by Dr. S. El

Mestikawy, Paris, France), anti-phospho-IR (1:500, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), anti-IR (1:500, Cell Signaling Technology), anti-phospho IRS1 (Ser636/639) (1:1000, Cell Signaling Technology), anti-IRS1 (1:1000, Cell Signaling Technology), anti-phospho-Akt (Ser473) (1:1000, Cell Signaling Technology) and anti-Akt (1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Secondary antibodies conjugated to IRDye 800CW or IRDye 680CW (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) were diluted to 1/15,000 in TBS with 5% BSA. Bands were visualized using Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). β -actin was used as internal control. Results were calculated as the percentage of optical density values of the control and, when stated, normalized to total levels of nonphosphorylated protein.

2.5. Data analysis.

Data were analyzed by SPSS for Windows, release 15.0 and normality was checked by Shapiro–Wilks’s test ($p < 0.05$). Data was analysed by one way ANOVA followed by Dunnett’s test.

3. Results

3.1. Effects of HFD and LA on cognition

HFD rats exhibited memory impairments (Figure 1), as shown by a significantly lower discrimination index compared with controls, that were reversed by LA treatment [$F_{2, 33} = 5.328$, $p < 0.01$; $n = 10-12$ per group]. These effects do not seem to be associated to differences in locomotor activity, as total distance travelled in the open field or discrimination index in the sample trial were not affected by HFD or LA treatment (data not shown).

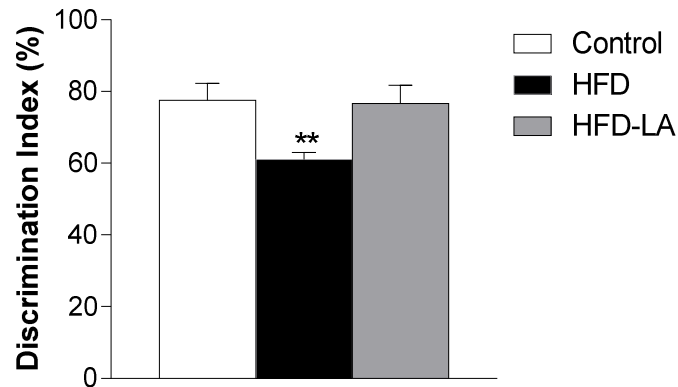


Figure 1. Treatment with lipoic acid (LA) reverses the cognitive deficit in high-fat-fed (HFD) rats in the novel object recognition test. Data shown as discrimination index (time exploring new object/total time of exploration*100). One-way ANOVA ** $p < 0.01$ vs control.

3.2. HFD induced both peripheral and central insulin resistance that is reversed by LA

HFD rats showed increased fasting plasma insulin and HOMA index (Fig 2a and b), and increased ketone bodies levels (Fig 2c) compared to control rats. All these effects were counteracted by LA administration [$F_{2, 31} = 16,60$, $p < 0,001$; $F_{2, 31} = 15,90$, $p < 0,001$; and $F_{2, 31} = 7,68$, $p < 0,01$ for insulin, HOMA index and levels of ketone bodies respectively, $n=10-12$ per group].

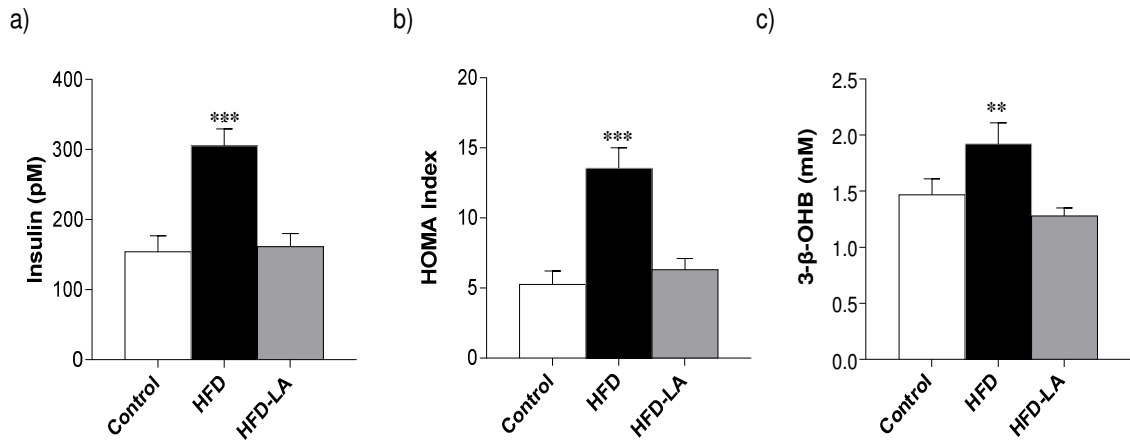


Figure 2. Effects of lipoic acid (LA) on peripheral insulin levels (a), HOMA index (b) and ketone bodies levels (c). One-way ANOVA **p<0.01, ***p<0.001 vs control.

These alterations in peripheral insulin levels were mirrored in the hippocampus, and HFD induced alterations in insulin signaling as shown by decreased activation of insulin receptor (IR) (Fig 3a), insulin receptor substrate-1 (IRS-1) (Fig 3b) and pAkt as marker of downstream signaling pathways (Fig 3c). These alterations in insulin signaling were accompanied by increased ketone bodies production (Fig 3d). Supplementation with LA prevented all these alterations [$F_{2,35}=6.483$, $p<0.01$; $F_{2,35}=3.486$, $p<0.05$; $F_{2,35}=11.789$, $p<0.001$ and $F_{2,30}=5.024$, $p<0.05$ respectively, $n=10-12$ per group]

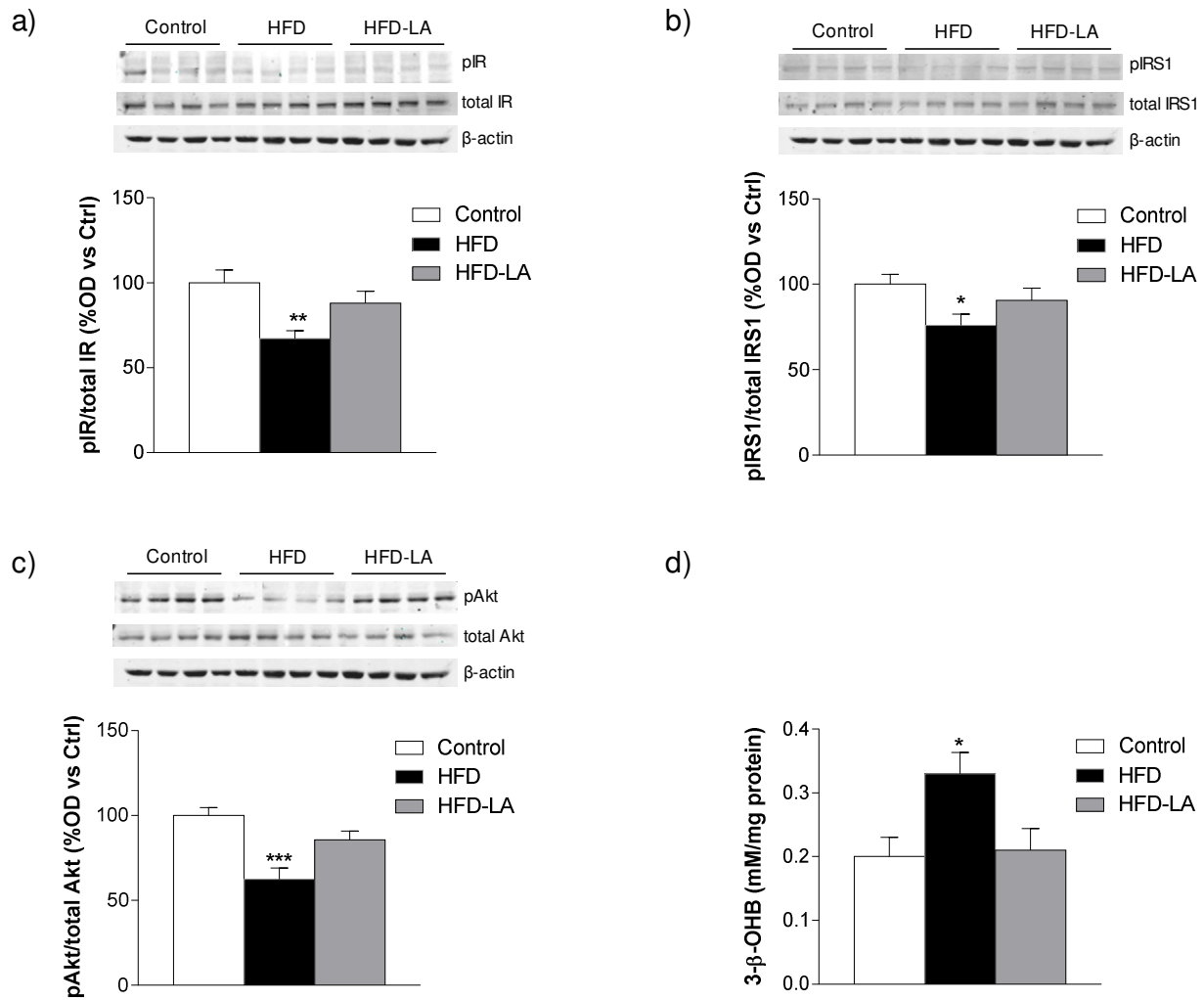


Figure 3. Lipoic acid (LA) reverses the effects of high fat diet (HFD) on insulin related pathways in the hippocampus. In (a) activation of insulin receptor (pIR); in (b) pIRS expression; in (c) activation of Akt; in (d) ketone bodies levels. The histograms represent the quantification of the immunochemically reactive bands in the western blot. Each panel shows percentage of optical density (O.D.) values of controls and representative picture of the blotting. Statistical analysis using One-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control. OD: optical density; IR: Insulin receptor; IRS: Insulin receptor substrate; 3-β-OHB: 3-β-hydroxybutyrate.

3.3. Effects of HFD and LA on VGLUT1 expression

As depicted in Figure 4, VGLUT1 levels were significantly decreased in the hippocampus of HFD rats, and this decrease was reversed by LA [$F_{2,34}=14.401$, $p < 0.001$, $n=10-12$ per group].

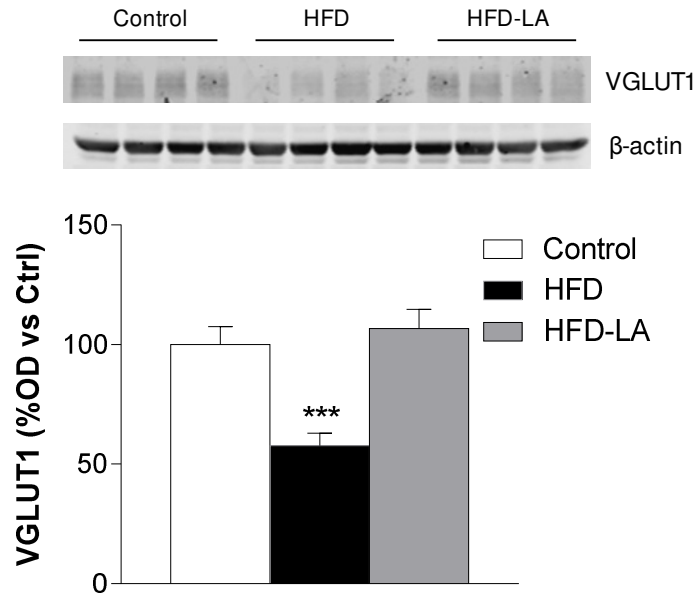


Figure 4. Lipoic acid (LA) reverses the effects of high fat diet (HFD) on VGLUT1 expression. The histograms represent the quantification of the immunochemically reactive bands in the western blot. Each panel shows percentage of optical density (O.D.) values of controls and representative picture of the blotting. Statistical analysis using One-way ANOVA, *** $p < 0.001$ vs control. . OD: optical density.

3.4. 3-β-hydroxybutyrate decreases glutamate release in cell culture

Increasing concentrations of the ketone body 3-β-hydroxybutyrate lead to a concentration dependent glutamate release reduction in neuronal primary cell culture [$F_{4,27}=4.043$, $p < 0.01$, $n=5-6$, Fig 5]. Further analysis showed that the significance was reached at 10μM, 1mM and 5 mM of 3-β-hydroxybutyrate (Dunnett's test, $p < 0.05$ for 10μM and $p < 0.01$ for 1 and 5 mM).

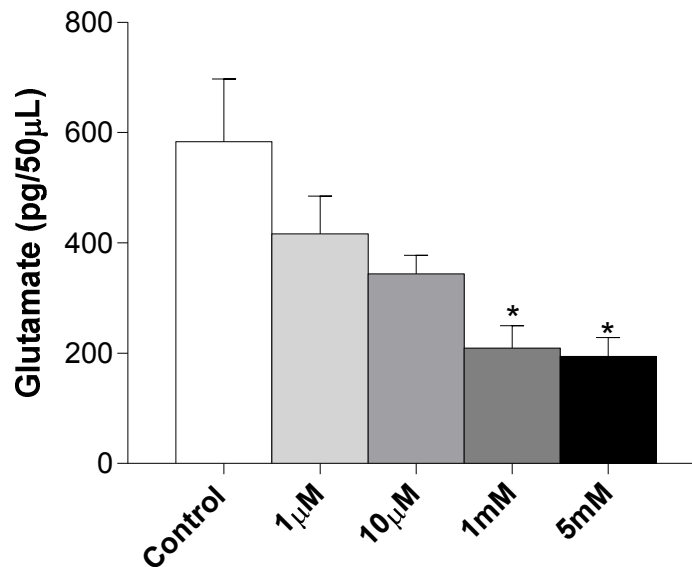


Figure 5. Effects 3-β-hydroxybutyrate administration on glutamate release in neuronal primary cell culture.

Statistical analysis using One-way ANOVA, * $p < 0.05$ vs control.

4. Discussion

In the present work it has been studied how the metabolic switch to obtain energy from ketone bodies in situations of HFD, could be related to the neurochemical (glutamatergic deficit) and cognitive deficits in AD. Apart from the genetic component and old age, environmental risk factors contributing to AD have been identified, such as diabetes mellitus or midlife obesity (Norton et al. 2014). Even though the epidemiological data suggest an existing relationship between AD and energy metabolism, molecular mechanisms behind this relationship are poorly understood. In addition to the classical amyloid and Tau hypothesis, mounting evidence suggests that impaired glucose and insulin signaling and metabolism in the brain play a key role in AD. The discovery of brain-specific insulin signaling deficiencies in the very early stages of AD pathogenesis has led some authors to propose that AD may be termed

“type 3 diabetes” (de la Monte et al. 2008). Prior research has established a clear relationship between obesity, insulin resistance, diabetes and dementia (White, 2014). Cognitive deficits associated to diabetes have been argued to be due in large part to an impaired central insulin modulation in the hippocampus, which is a critical region for memory processing (McNay et al. 2011).

In order to further investigate the underlying molecular events linking brain energy metabolism to AD, it has been chosen for the present work a well-established experimental approach to induce insulin resistance in peripheral organs of rodents consists of a HFD treatment, which results in obesity (Prieto-Hontoria et al. 2009; Moreno-Aliaga et al. 2011; Arnold et al. 2014). In our hands, HFD treatment produced not only peripheral metabolic syndrome (including hyperinsulinemia or insulin resistance), but also central insulin signaling alterations. Binding of the insulin to the extracellular alpha subunit of the IR initiates a series of Tyr autophosphorylations in the beta subunit, disinhibiting intracellular Tyr kinase activity towards IRS, thereby allowing these adaptor molecules to interact with a large number of targets. Once activated, IRS1 and 2 are further regulated via a highly complex mechanism involving multiple Ser/Thr kinases, which can phosphorylate the tail regions of IRS molecules at over 50 Ser/Thr residues. Therefore, alterations in insulin signaling in AD could be associated to defects in IR itself (Pessin et al. 2000) or may be mediated via negative regulation of the IRS. Activated IRS recruits PI3K, thus activating downstream signaling cascade involving Akt. Our data demonstrate HFD decrease hippocampal pIR, pIRS or pAkt levels, results that are in line with previously published postmortem examinations of the brains of human patients suffering from AD and diabetes (Liu et al. 2011); Rodriguez-Perdigon et al., submitted)

Impairment of neuronal insulin receptor function is demonstrated to be correlated with cognitive decline (Greenwood et al. 2005; Moloney et al. 2010), as shown in the present work by deficits in performance in the NORT shown by the HFD group and previously described (Wang et al. 2015). In a recent work (Petrov et al. 2015), it has been shown that HFD administration starting at the time of weaning is sufficient to produce β -amyloid-independent, hippocampal-dependent memory deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP/PS1) mice, a well-established mouse model of familial AD as early as 6 months of age.

Impairments in insulin signalling might lead to deficits in energy metabolism with associated increases in oxidative stress, proinflammatory cytokine activation and mitochondrial bioenergetics dysfunction (Rivera et al. 2005; de la Monte et al. 2005; Soscia et al. 2006; de la Monte et al. 2006). Collectively, this results in a shift in brain metabolic profile from glucose-driven bioenergetics towards a compensatory, but less efficient, ketogenic pathway (Yao et al. 2011) that seems to occur in early AD (Yao et al. 2009) and presently shown in HFD animals. High-fat, low-carbohydrate diets promote ketone bodies formation, mainly in the mitochondrial matrix of liver cells, which are then exported to other organs to cover the energy demands (Vidali et al. 2015). It is to note that diet-induced obesity results in the disruption of the blood-brain-barrier, and therefore, the origin of the increased ketone bodies levels in the hippocampus could be the periphery.

It is known that neuronal VGLUTs requires glucose for optimum function (Ikemoto et al. 2003) and, it has been suggested that excessive ketone bodies levels regulates VGLUTs activity and can block release of glutamate from VGLUTs (Juge et al. 2010). Therefore, it is possible to speculate that deficiencies in hippocampal insulin signaling could switch metabolism to produce ketone bodies which in turn,

might lead to a decreased expression of VGLUT1, and therefore to a decreased release of glutamate. Interestingly, down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in AD (Kirvell et al. 2006) and loss of VGLUT1 in the prefrontal cortex is correlated with cognitive decline in AD (Kashani et al. 2008). Supporting our hypothesis, the present data show that increasing concentrations of 3- β -hydroxybutyrate lead to a concentration dependent glutamate release reduction in neuronal primary cell culture. In addition, it has already been shown that replacement of glucose in the medium with β -hydroxybutyrate reduces glutamate in cultured neurons (Lund et al. 2009) and that NMDA receptor-induced calcium responses in neurons were diminished in the presence of β -hydroxybutyrate (Lund et al. 2014). In fact, diet supplementation with ketone bodies has been used for treating central pathologies, such as epilepsy, associated to increased excitatory tone.

As a second objective of the present work, it was suggested that treatments able to reverse HFD-induced insulin pathways alterations are potential candidates for the treatment of AD. LA is a naturally occurring short chain fatty acid, present in plants and animals. It has been shown that reduced endogenous levels of LA increased oxidative stress, which, in turn, leads to increased insulin resistance, mitochondrial dysfunction, and inflammation. Moreover, LA synthase gene expression is downregulated in animal models of diabetes and obesity both in skeletal muscle and adipose tissue (Padmalayam et al. 2009). Thus, LA has been proposed as a novel therapeutic approach for chronic inflammatory diseases such as diabetes. Our current data clearly show that dietary supplementation with LA prevents both peripheral and central alterations in insulin signalling and the elevation of ketone bodies when a HFD is consumed, supporting the ability of LA to counteract the development of insulin resistance even under this obesogenic condition. Not only this, but LA administration reversed cognitive deficits

in HFD animals, perhaps by normalizing VGLUT1 (glutamatergic) function. In line with the present study it has been described a hypermetabolic state in the 7-month-old triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease that is reversed by administering LA (Sancheti et al. 2014). The ability of LA supplementation to prevent insulin resistance in HFD rats might be related, at least in part, to the stimulation of AMPK (Prieto-Hontoria et al. 2013).

Altogether, the present results support the hypothesis that HFD-induced insulin resistance could switch metabolism to produce ketone bodies, which in turn, might contribute to the pathophysiology of AD, and to its characteristic glutamatergic deficit (Kirvell et al. 2010). The results of the present study could help not only to a better understanding of the common mechanisms that could link and underlie both diabetes and AD, but also to consider new therapeutic options. The identification of ketone bodies as physiological modulators of VGLUTs has opened the path for novel approaches in the development of drugs to treat neurological disorders caused by altered glutamatergic neurotransmission. However, it is also to note that controversial effects have been found when modulating ketone bodies administration to treat AD (Hertz et al. 2015). At this point it is important to note that the metabolic state of brains is different at preclinical stages compared to demented AD patients, and therefore, the effects of altering ketone bodies production could be different considering the stage of the illness. In a research field still awaiting substantial progress in therapeutic options, the idea of AD as a brain type of diabetes mellitus is now being translated into clinical trials with promising early results and it is considered nowadays that effective management of diabetes might prevent or delay the onset of the illness. Therefore, LA by reversing metabolic abnormalities associated to obesity and insulin resistance could be considered

as a purported new drug for the treatment of cognitive and neurochemical disturbances in AD.

Acknowledgements

This work has been supported by a grant from FIS (13/00858), Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (AGL 2009-10873/ALI), Línea Especial de Investigación “Nutrición, Obesidad y Salud”, University of Navarra-Spain LE/97

References

- Arnold, S. E., Lucki, I., Brookshire, B. R., Carlson, G. C., Browne, C. A., Kazi, H., Bang, S. et al.** 2014. «High Fat Diet Produces Brain Insulin Resistance, Synaptodendritic Abnormalities and Altered Behavior in Mice». *Neurobiology of Disease* 67 (7): 79-87.
- Barbagallo, M. and Dominguez, L. J.** 2014. «Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease». *World Journal of Diabetes* 5 (6): 889-93.
- Bengoetxea, X., Rodriguez-Perdigon, M., and Ramirez, M. J.** 2015. «Object Recognition Test for Studying Cognitive Impairments in Animal Models of Alzheimer's Disease». *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 7: 10-29.
- Caselli, R. J., Chen, K., Lee, W., Alexander, G. E., and Reiman, E. M.** 2008. «Correlating Cerebral Hypometabolism with Future Memory Decline in Subsequent Converters to Amnesic Pre-Mild Cognitive Impairment». *Archives of Neurology* 65 (9): 1231-36.
- Danbolt, N. C.** 2001. «Glutamate Uptake». *Progress in Neurobiology* 65 (1): 1-105.
- De la Monte, S. M and Wands, J. R.** 2005. «Review of Insulin and Insulin-like Growth Factor Expression, Signaling, and Malfunction in the Central Nervous System: Relevance to Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 7 (1): 45-61.
- 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». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 9 (2): 167-81.
- De la Monte, S. M and Wands, J. R.** 2008. «Alzheimer's Disease Is Type 3 Diabetes-Evidence Reviewed». *Journal of Diabetes Science and Technology* 2 (6): 1101-13.
- Fernández-Galilea, M., Pérez-Matute, P., Prieto-Hontoria, P.L., Houssier, M., Burrell, M. A., Langin, D., Martínez, J. A. and Moreno-Aliaga, M. J.** 2015. «A-Lipoic Acid

Treatment Increases Mitochondrial Biogenesis and Promotes Beige Adipose Features in Subcutaneous Adipocytes from Overweight/obese Subjects». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1851 (3): 273-81.

Fernández-Galilea, M., Pérez-Matute, P., Prieto-Hontoria, P.L., Sáinz, N., López-Yoldi, M., Houssier, M., Martínez, J. A., Langin, D. and Moreno-Aliaga, M. J. 2014. «A-Lipoic Acid Reduces Fatty Acid Esterification and Lipogenesis in Adipocytes from Overweight/obese Subjects». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 22 (10): 2210-15.

Flanagan, A. M., Brown, J. L., Santiago, C. A., Aad, P. Y., Spicer, L. J. and Spicer, M. T. 2008. «High-Fat Diets Promote Insulin Resistance through Cytokine Gene Expression in Growing Female Rats». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19 (8): 505-13.

Fonnum, F. 1984. «Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain». *Journal of Neurochemistry* 42 (1): 1-11.

Freneau, R. T., Troyer, M. D., Pahner, I., Nygaard, G. O., Reimer, R. J., Bellocchio, E. E., Fortin, D., Storm-Mathisen J and Edwards, R. H. 2001. «The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse». *Neuron* 31 (2): 247-60.

Freneau, R. T., Kam, K., Qureshi, T., Johnson, J., Copenhagen, D. R., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F. A., Nicoll, R. A. and Edwards, R. H. 2004. «Vesicular Glutamate Transporters 1 and 2 Target to Functionally Distinct Synaptic Release Sites». *Science (New York, N.Y.)* 304 (5678): 1815-19.

Greenwood, C. E., and Winocur, G. 2005. «High-Fat Diets, Insulin Resistance and Declining Cognitive Function». *Neurobiology of Aging* 26 Suppl 1 (December): 42-45.

Hertz, L., Chen, Y. and Waagepetersen. H. S. 2015. «Effects of Ketone Bodies in Alzheimer's Disease in Relation to Neural Hypometabolism, B-Amyloid Toxicity, and

Astrocyte Function». *Journal of Neurochemistry*, April.

Hokama, M., Oka, S., Leon, J., Ninomiya, T., Honda, H., Sasaki, K., Iwaki, T. et al. 2014. «Altered Expression of Diabetes-Related Genes in Alzheimer's Disease Brains: The Hisayama Study». *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 24 (9): 2476-88.

Hoyer, S. 2002. «The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update». *Journal of Neural Transmission. Parkinson's Disease and Dementia Section* 109 (1): 341-60.

Hoyer, S., Nitsch, R., and Oesterreich, K. 1991. «Predominant Abnormality in Cerebral Glucose Utilization in Late-Onset Dementia of the Alzheimer Type: A Cross-Sectional Comparison against Advanced Late-Onset and Incipient Early-Onset Cases». *Journal of Neural Transmission. Parkinson's Disease and Dementia Section* 3 (1): 1-14.

Huerta, A. E., Navas-Carretero, S., Prieto-Hontoria, P. L., Martínez, J. A. and Moreno-Aliaga, M. J. 2015. «Effects of A-Lipoic Acid and Eicosapentaenoic Acid in Overweight and Obese Women during Weight Loss». *Obesity* 23 (2): 313-21.

Ikemoto, A., Bole, D. G. and Ueda, T. 2003. «Glycolysis and Glutamate Accumulation into Synaptic Vesicles. Role of Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase and 3-Phosphoglycerate Kinase». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (8): 5929-40.

Juge, N., Gray, J. A., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., Uneyama, H., Edwards, R. H., Nicoll, R. A. and Moriyama, Y. 2010. «Metabolic Control of Vesicular Glutamate Transport and Release». *Neuron* 68 (1): 99-112.

Kashani, A., Lepicard, E., Poirel, O., Videau, C., David, J. P., Fallet-Bianco, C., Simon, A. et al. 2008. «Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the Prefrontal Cortex Is Correlated with Cognitive Decline in Alzheimer Disease». *Neurobiology of Aging* 29 (11): 1619-30.

Kim, M.S., Park, J. Y., Namkoong, C., Jang, P. G., Ryu, J. W., Song, H. S., Yun, J. Y.

et al. 2004. «Anti-Obesity Effects of Alpha-Lipoic Acid Mediated by Suppression of Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase». *Nature Medicine* 10 (7): 727-33.

Kirvell, S. L., Esiri, M. and Francis, P. T. 2006. «Down-Regulation of Vesicular Glutamate Transporters Precedes Cell Loss and Pathology in Alzheimer's Disease». *Journal of Neurochemistry* 98 (3): 939-50.

Kirvell, S. L., Elliott, M. S., Kalaria, R. N., Hortobágyi, T., Ballard, C. G. and Francis, P. T. 2010. «Vesicular Glutamate Transporter and Cognition in Stroke: A Case-Control Autopsy Study». *Neurology* 75 (20): 1803-9.

Langbaum, J. B. S., Chen, K., Caselli, R. J., Lee, W., Reschke, C., Bandy, D., Alexander, G. E. et al. 2010. «Hypometabolism in Alzheimer-Affected Brain Regions in Cognitively Healthy Latino Individuals Carrying the Apolipoprotein E epsilon4 Allele». *Archives of Neurology* 67 (4): 462-68.

Leino, R.L., Gerhart, D.Z., Duelli, R., Enerson, B.E. and Drewes, L.R. 2001, «Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain», *Neurochemistry international*, 38 (6): 519-527.

Liu, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. and Gong, C. X. 2011. «Deficient Brain Insulin Signalling Pathway in Alzheimer's Disease and Diabetes». *The Journal of Pathology* 225 (1): 54-62.

Lund, T. M., Ploug, K. B., Iversen, A., Jensen, A. A. and Jansen-Olesen, Inger. 2014. «The Metabolic Impact of B-Hydroxybutyrate on Neurotransmission: Reduced Glycolysis Mediates Changes in Calcium Responses and KATP Channel Receptor Sensitivity». *Journal of Neurochemistry*, October.

Lund, T. M., Risa, O., Sonnewald, U., Schousboe, A. and Waagepetersen, H. S. 2009. «Availability of Neurotransmitter Glutamate Is Diminished When Beta-Hydroxybutyrate Replaces Glucose in Cultured Neurons». *Journal of Neurochemistry*

110 (1): 80-91.

Ma, L., Wang, J. and Li, Yun. 2015. «Insulin Resistance and Cognitive Dysfunction». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 444 (February): 18-23.

McEntee, W. J. and Crook, T. H. 1993. «Glutamate: Its Role in Learning, Memory, and the Aging Brain». *Psychopharmacology* 111 (4): 391-401.

McNay, E. C. and Recknagel, A. K. 2011. «Brain Insulin Signaling: A Key Component of Cognitive Processes and a Potential Basis for Cognitive Impairment in Type 2 Diabetes». *Neurobiology of Learning and Memory* 96 (3): 432-42.

Mitew, S., Kirkcaldie, M. T. K., Dickson, T. C. and Vickers, J. C. 2013. «Altered Synapses and Gliotransmission in Alzheimer's Disease and AD Model Mice». *Neurobiology of Aging* 34 (10): 2341-51.

Moloney, A. M., Griffin, R. J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R. and O'Neill, O. 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): 224-43.

Moreno-Aliaga, M. J., Pérez-Echarri, N., Marcos-Gómez, B., Larequi, E., Gil-Bea, F. J., Viollet, B., Gimenez, I., Martínez, J. A., Prieto, J. and Bustos, M. 2011. «Cardiotrophin-1 Is a Key Regulator of Glucose and Lipid Metabolism». *Cell Metabolism* 14 (2): 242-53.

Mosconi, L., Pupi, A. and De Leon, M. J. 2008. «Brain Glucose Hypometabolism and Oxidative Stress in Preclinical Alzheimer's Disease». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147 (December): 180-95.

Mosconi, L., Sorbi, S., De Leon, M. J., Li, Y., Nacmias, B., Myoung, P. S., Tsui, W. et al. 2006. «Hypometabolism Exceeds Atrophy in Presymptomatic Early-Onset

Familial Alzheimer's Disease». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 47 (11): 1778-86.

Norton, S., Matthews, F. E., Barnes, D. E., Yaffe, K. and Brayne, C. 2014. «Potential for Primary Prevention of Alzheimer's Disease: An Analysis of Population-Based Data». *The Lancet. Neurology* 13 (8): 788-94.

Padmalayam, I., Hasham, S., Saxena, U., and Pillarisetti, S. 2009. «Lipoic Acid Synthase (LASY): A Novel Role in Inflammation, Mitochondrial Function, and Insulin Resistance». *Diabetes* 58 (3): 600-608.

Pessin, J. E., and Saltiel, A. R. 2000. «Signaling Pathways in Insulin Action: Molecular Targets of Insulin Resistance». *The Journal of Clinical Investigation* 106 (2): 165-69.

Petrov, D., Pedrós, I., Artiach, G., Sureda, F. X., Barroso, E., Pallàs, M., Casadesús, G. et al. 2015. «High-Fat Diet-Induced Deregulation of Hippocampal Insulin Signaling and Mitochondrial Homeostasis Deficiencies Contribute to Alzheimer Disease Pathology in Rodents». *Biochimica Et Biophysica Acta*, May.

Prieto-Hontoria, P.L., Pérez-Matute, P., Fernández-Galilea, M., Martínez, J. A. and Moreno-Aliaga, M. J. 2013. «Effects of Lipoic Acid on AMPK and Adiponectin in Adipose Tissue of Low- and High-Fat-Fed Rats». *European Journal of Nutrition* 52 (2): 779-87.

Prieto-Hontoria, P.L., Pérez-Matute, P., Fernández-Galilea, M., Martínez, J. A. and Moreno-Aliaga, M. J. 2011. «Lipoic Acid Inhibits Leptin Secretion and Sp1 Activity in Adipocytes». *Molecular Nutrition & Food Research* 55 (7): 1059-69.

Prieto-Hontoria, P.L., Pérez-Matute, P., Fernández-Galilea, Barber., A., M., Martínez, J. A. and Moreno-Aliaga, M. J. 2009. «Lipoic Acid Prevents Body Weight Gain Induced by a High Fat Diet in Rats: Effects on Intestinal Sugar Transport». *Journal of*

Physiology and Biochemistry 65 (1): 43-50.

Qiu, W. Q. and Folstein, M. F. 2006. «Insulin, Insulin-Degrading Enzyme and Amyloid-Beta Peptide in Alzheimer's Disease: Review and Hypothesis». *Neurobiology of Aging* 27 (2): 190-98.

Ribot, J., Rodríguez, A. M., Rodríguez, E. and Palou, A. 2008. «Adiponectin and Resistin Response in the Onset of Obesity in Male and Female Rats». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 16 (4): 723-30.

Rivera, E. J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J. R. and 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: JAD* 8 (3): 247-68.

Sancheti, H., Kanamori, K., Patil, I., Brinton, R. D., Ross, B. D. and Cadenas, E. 2014. «Reversal of Metabolic Deficits by Lipoic Acid in a Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease: A ¹³C NMR Study». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34 (2): 288-96.

Soscia, S. J., Tong, M., Xu, X. J., Cohen, A. C., Chu, J., Wands, J. R. and de la Monte, S. M. 2006. «Chronic Gestational Exposure to Ethanol Causes Insulin and IGF Resistance and Impairs Acetylcholine Homeostasis in the Brain». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63 (17): 2039-56.

Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Xu, R. T., Xu, J., Wands, K. R. and 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: JAD* 7 (1): 63-80.

Talbot, K., Wang, H. Y., Kazi, H., Han, L- Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., Fuino, R. L.

et al. 2012. «Demonstrated Brain Insulin Resistance in Alzheimer's Disease Patients Is Associated with IGF-1 Resistance, IRS-1 Dysregulation, and Cognitive Decline». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (4): 1316-38.

Valdecantos, M. P., Pérez-Matute, P., González-Muniesa, P., Prieto-Hontoria, P. L., Moreno-Aliaga, M. J. and Martínez, J.A. 2012a. «Lipoic Acid Administration Prevents Nonalcoholic Steatosis Linked to Long-Term High-Fat Feeding by Modulating Mitochondrial Function». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 23 (12): 1676-84.

Valdecantos, M. P., Pérez-Matute, P., González-Muniesa, P., Prieto-Hontoria, P. L., Moreno-Aliaga, M. J. and Martínez, J.A. 2012b. «Lipoic Acid Improves Mitochondrial Function in Nonalcoholic Steatosis through the Stimulation of Sirtuin 1 and Sirtuin 3». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 20 (10): 1974-83.

Vidali, S., Aminzadeh, S., Lambert, B., Rutherford, T., Sperl, W., Kofler, B. and Feichtinger, R. G. 2015. «Mitochondria: The Ketogenic Diet-A Metabolism-Based Therapy». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 63 (junio): 55-59.

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». *Cellular and Molecular Neurobiology*, May.

White, M. F. 2014. «IRS2 Integrates insulin/IGF1 Signalling with Metabolism, Neurodegeneration and Longevity». *Diabetes, Obesity & Metabolism* 16 Suppl 1 (September): 4-15.

Wojcik, S. M., Rhee, J. S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N. and Rosenmund, C. 2004. «An Essential Role for Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGLUT1) in Postnatal Development and Control of Quantal Size». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (18): 7158-63.

Yao, J., Irwin, R.W., Zhao, L., Nilsen, J., Hamilton, R. T. and Brinton, R. D. 2009.

«Mitochondrial Bioenergetic Deficit Precedes Alzheimer's Pathology in Female Mouse Model of Alzheimer's Disease». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (34): 14670-75.

Yao, J., Rettberg, J.R., Klosinski, L.P., Cadenas, E. and Brinton, R. D. 2011. «Shift in Brain Metabolism in Late Onset Alzheimer's Disease: Implications for Biomarkers and Therapeutic Interventions». *Molecular Aspects of Medicine* 32 (4-6): 247-57.

Zheng, W. H., and Quirion, R. 2009. «Glutamate Acting on N-Methyl-D-Aspartate Receptors Attenuates Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Tyrosine Phosphorylation and Its Survival Signaling Properties in Rat Hippocampal Neurons». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (2): 855-61.

CAPÍTULO V

Chapter 5

Down-regulation of glutamatergic terminals (VGLUT1)

driven by A β in Alzheimer's disease

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is characterized phenotypically by memory impairment, histologically by accumulation of pTau and β -amyloid peptide and morphologically by a loss of nerve terminals in cortical and hippocampal regions. As glutamate is the principle excitatory neurotransmitter of the CNS, the glutamatergic system may play an important role in AD. To date, not many studies have addressed the deleterious effects of A β on glutamatergic terminals; therefore the aim of this study was to investigate how A β affects glutamatergic terminals and to assess the extent to which alterations in the glutamatergic neurotransmission could impact susceptibility to the illness. The present study shows that A β caused a loss of glutamatergic terminals, measured by VGLUT1 protein levels, in Tg2576 primary cell cultures, Tg2576 mice and AD patient brains, and also when A β was added exogenously to hippocampal cell cultures. Interestingly, no correlation was found between cognition and decreased VGLUT1 levels. Moreover, when A β_{1-42} was intracerebroventricularly administered into VGLUT1 \pm mice, increased neuroinflammation was observed in the hippocampus of those animals. In conclusion, the present study not only revealed susceptibility of glutamatergic nerve terminals to A β induced toxicity but also underlined the importance of VGLUT1 in the progression of AD, as the decrease of this protein levels could increase the susceptibility to subsequent deleterious inputs by exacerbating A β induced neuroinflammation.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common age-related neurodegenerative disease in the developed world. The disease is clinically characterized by an initial deterioration of memory performance that evolves over time. Along with tangles and plaques, the most consistent morphological feature related to memory impairment in early AD is the loss of synapses (Scheff et al. 2006; Terry et al. 1991) and of synaptic markers (Sze et al. 2000), which is also found in different animal models of AD (Mucke et al. 2000; Jacobsen et al. 2006; Canas et al. 2009). Indeed, synapse loss has been reported to occur very early in AD-affected brain regions such as frontal or temporal cortex and correlates closely with cognitive decline (Scheff et al. 2006; Terry et al. 1991).

Albeit the cause of AD is still unknown, the abnormal production of soluble forms of β -amyloid peptides (A β), such as A β_{1-42} , has been proposed as a major culprit in AD (Hardy et al. 2002). Synapse and dendritic spine loss appear to be exacerbated in proximity to fibrillar A β plaques (Knafo et al. 2009; Koffie et al. 2012), suggesting that plaques can alter the functionality of neuronal synapses (Palop et al. 2007; Rudinskiy et al. 2012). In this line, the exposure to A β is correlated (Näslund et al. 2000; Fagan et al. 2007) and induces memory impairment (reviewed in (Selkoe, 2008)); therefore the intracerebroventricular (icv) administration of A β is nowadays a stablished model of experimental AD (Lawlor et al. 2011)

It has been suggested that AD progresses in a neurotransmitter-specific manner with an early degeneration of cholinergic synapses (Ikonomic et al. 2003), followed by glutamatergic neurotransmission and leaving inhibitory γ -aminobutyric acid (GABA) signaling almost unaffected (Bell et al. 2006). Although cholinergic depletion is an established hallmark in AD (Mesulam, 2004), less is known about the functional

consequences of the glutamatergic loss. Glutamate is the major excitatory neurotransmitter of the brain and is thus involved in higher mental functions such as cognition, learning and memory (Danbolt, 2001). To date, not many studies have addressed the deleterious effects of A β on glutamatergic terminals using *in vivo* experimental models (Bell et al. 2006; Masliah et al. 2000) and only one study to our knowledge has addressed the effects of A β accumulation on glutamate release *in vivo* (Minkeviciene et al. 2008). Moreover, some authors have reported reduced levels of glutamate in the brains of AD patients (Rupsingh et al. 2011) and have suggested a particular vulnerability of glutamatergic synapses (Kirvell et al. 2006; Kashani et al. 2008; Minkeviciene et al. 2008; Proctor et al. 2010).

Loading of synaptic vesicles with glutamate is mediated by a small family of vesicular glutamate transporters termed VGLUTs (Edwards, 2007) and three isoforms of VGLUTs have been identified (VGLUT1–3) (Bellocchio et al. 2000; Takamori et al. 2000). VGLUT1 is expressed mainly in the cerebral and cerebellar cortices. With the availability of VGLUT1 specific antibody, the measurement of this protein levels has been used as a glutamatergic terminal marker. Conflicting results regarding VGLUT1 expression in AD post-mortem brain tissue could be found in literature, as no changes (Kirvell et al. 2010), reduced levels (Bell et al. 2007; Kashani et al. 2008), or even regional differences in VGLUT1 expression (Kirvell et al. 2006) has been described in AD.

Because of the discrepancy between studies, the involvement of excitatory synapses in AD remains unclear. Therefore, the aim of this study was i) to investigate how A β affects glutamatergic neurotransmission, using VGLUT1 as a biomarker of glutamatergic terminals and ii) to assess the extent to which VGLUT1 protein

alterations can impact in other deleterious mechanisms that accelerate AD progression, such as synaptic plasticity disruption or neuroinflammation.

2. Material and methods

2.1. Patients, clinical, and neuropathological data and tissue processing

Brain tissues were obtained from the Oxford Project to Investigate Memory and Ageing (OPTIMA, see www.medsci.ox.ac.uk/optima). Subjects for this study constituted a randomly selected subset of the participants, now part of the Thomas Willis Oxford Brain Collection within the Brains for Dementia Research Initiative (BDR). Subjects were assessed annually for cognitive status using the Mini Mental State Examination (MMSE) (Folstein et al. 1975). At death, informed consent had been obtained from the patients' next-of-kin before collection of brains. All subjects fulfilled Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) criteria for the neuropathological diagnosis of AD and were staged at Braak V/VI. Controls did not have dementia or other neurological diseases, did not meet CERAD criteria for AD diagnosis, and were staged at Braak 0-II. Frontal (Brodmann area [BA]10) cortex were dissected free of meninges. All tissue used had a brain pH > 6.1, a condition used as an indication of tissue quality in postmortem research (Lewis, 2002). Semiquantitative scores of neuritic plaque burden (0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe) was performed on cortical sections using methanamine silver/modified Palmgren staining as previously described (Lai et al. 2001).

2.2. Animals

In this study, 8 and 16 months old Tg2576 AD transgenic mice that express the human 695-aa isoform of APP containing the Swedish double mutation (APP^{swe}) were used. In this AD mouse model, A β peptide content in the brain accumulates exponentially associated to ageing (Hsiao et al. 1996).

Heterozygous VGLUT1 male mice (VGLUT1^{+/-}) C57BL/6N were bred from heterozygous fathers (Dr. S. Wojcik, Gottingen, Germany) and wildtype (WT) mothers (Harlan, France). These mice show ~40% decrease of VGLUT1 protein levels (Garcia-Garcia et al. 2009).

The animals were housed in a temperature- (21 ± 1 °C) and humidity- ($55 \pm 5\%$) controlled room on a 12-h light/dark cycle. Experimental procedures were conducted in accordance with the European and Spanish regulations (2003/65/EC; 1201/2005) for the care and use of laboratory animals and approved by the Ethical Committee of University of Navarra (068-11).

2.3. Morris Water Maze

The MWM, a hippocampus-dependent learning task, was used to test spatial memory and to evaluate the working and reference memory functions in Tg2576 mice.

The water maze was a circular pool (diameter of 145 cm) filled with water ($21-22$ °C) and virtually divided into four equal quadrants identified as northeast, northwest, southeast, and southwest.

Hidden-platform training was conducted with the platform placed in the northeast quadrant 1 cm below the water surface over 9 consecutive days (4 trials/day). Several large visual cues were placed in the room to guide the mice to the hidden platform. Each

trial was finished when the mouse reached the platform (escape latency) or after 60 s, whichever came first. Mice failing to reach the platform were guided onto it. After each trial mice remained on the platform for 15 s. To test memory retention, one probe trial was performed at the last day of the test (day 10). In the probe trials the platform was removed from the pool and mice were allowed to swim for 60 s. The percent of time spent in the target quadrant was recorded. All trials were monitored by a video camera set above the center of the pool and connected to a video tracking system (Ethovision 3.0; Noldus Information Technology B.V, Wageningen, Netherlands).

2.4. Neuronal primary cell cultures

Hippocampal tissues from 19-day-old wild type or Tg2576 mice embryos were homogenized in serum-free NeuroBasal medium with 2% B27 supplement (Invitrogen, CA, USA). Cells from each embryo were seeded separately in dishes that were pre-coated with poly-D-lysine MW 300 000 (0.17 mg/ml, Sigma-Aldrich, MO, USA) in PBS. Cells were grown for 15 days and the culture medium was changed every fourth day. At the 15th day, only in the wild type cultures, 8 μ M A β were added to a fresh and pre-warm medium, and cells were collected 24 hours after the treatment.

2.5. Glutamate levels

Glutamate released from cell cultures was measured using high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection (Waters Spheribor 5X ODS2 4,6x150mm) including precolumn derivatization with ophthalaldehyde (Sigma Aldrich Ltd, Germany) and β -mercaptoethanol (Sigma Aldrich Ltd, Germany). The mobile phase consisted of 72:28 (v/v) mixture of buffer NaH₂PO₄ 0.1M, pH 5.5) and methanol;

the mixture was filtered and degassed through a 0.22 mm nitrocellulose membrane (Millipore, UK). Glutamate content was calculated by comparing with a 2 ng standard. The detection limit was 20 pg/10 ml for glutamate content.

2.6. Peptides and soluble A β -species preparation

A β_{1-42} peptide was purchased by Bachem laboratories (Bubendorf, Switzerland). For assuring monomerization, 1 mg of A β_{1-42} protein was dissolved to 1 mM in hexafluoroisopropanol (HFIP) and aliquoted into microcentrifuge tubes, then the HFIP was evaporated, and the peptides were stored at -20°C until use. For oligomeric assembly, concentrated peptides were resuspended in DMSO and then diluted to 100 μ M in phenol red-free media and incubated at 4°C for 24 h.

2.7. A β injection

Intracerebroventricular (icv) injection of A β_{1-42} (300 pmol in 3 μ l sterile ddw containing 10% DMSO) was stereotaxically performed in both lateral ventricles (anterior–posterior, +0.3 mm; lateral, 1.0 mm; horizontal, 3.0 mm from the bregma) of 9 months-old male wild type or VGLUT1+/- mice. Sham animals received equivalent amounts of sterile phosphate buffer saline. Mice were sacrificed 7 days after the injection.

2.8. Measurement of A β levels

A β_{1-42} levels were determined using a commercially available high-sensitive enzyme-linked immunosorbent assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan) following manufacturer instructions.

2.9. Tissue collection

Mice were killed by decapitation between 08.00–10.00 h. Brains were removed and dissected on ice to obtain the hippocampus and stored at -80°C .

For immunohistochemistry assays, left hemispheres from 5 mice per group were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 24 h followed by 20% sucrose solution. Brains were cut into series of 30 μm slides.

2.10. Western blotting

Assays were performed in hippocampal tissue as described previously (Solas et al. 2010). Samples (50 μg of protein) were separated by electrophoresis on a sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel (10%). Membranes were probed overnight at 4°C with the corresponding primary antibodies: anti-VGLUT1 (1:2000, donated by Dr. S. El Mestikawy, Paris, France), anti-Synaptophysin (1:1000, Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA), anti-PSD95 (1:1000, Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA), anti-GFAP (1:1000, Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA) and anti-Iba1 (1:1000, Wako, Osaka, Japan). Secondary antibodies conjugated to IRDye 800CW or IRDye 680CW (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) were diluted to 1/15,000 in TBS with 5% BSA. Bands were visualized using Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). β -actin was used as internal control. Results were calculated as the percentage of optical density values of the wild type. For the visualization of icv injected A β oligomers, increasing concentrations (1, 2.5, 5, 8 and 10 μM) of previously aggregated A β_{1-42} solution was subjected to SDS-PAGE electrophoresis in non-thermal denaturated conditions (samples were not boiled before loading). The separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes for

determining the presence of different A β aggregates with 6E10 as primary antibody (Abcam, Cambridge, MA, USA). Blots were incubated and revealed under the conditions previously described.

2.11. Immunofluorescence staining

For immunofluorescence, free-floating brain mice sections were washed (3 \times 10 min) with PBS 0.1 M (pH 7.4) and incubated in blocking solution (PBS containing 0.3% Triton X-100, 0.1% BSA and 2% normal donkey serum) for 2 h at room temperature. Primary and secondary antibodies were diluted in the blocking solution. Sections were incubated with the primary antibody overnight at 4°C, washed with PBS and incubated with the secondary antibody for 2 h at room temperature, protected from light. The primary antibodies used were anti-GFAP (1:250, Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA) and anti-Iba1 (1:500, Wako, Wako, Osaka, Japan). Secondary antibody used was Alexa Fluor 546 goat anti-mouse for GFAP and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit for Iba1 (1:200, Invitrogen–Molecular Probes, Eugene, OR, USA). For better visualization of nuclei, sections were rinsed 10min in the DNA marker TOPRO-3 (Invitrogen–Molecular Probes, Eugene, OR, USA) working concentration 4 μ M in PBS, and then washed 2 min in PBS before mounting. To ensure comparable immunostaining, sections were processed together under identical conditions. Fluorescence signals were detected with confocal microscope LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.12. Cresyl violet staining (Nissl)

The mounted and dried sections were rehydrated, incubated in a 0.5% solution of cresyl violet containing acetic acid, dehydrated with ethanol, cleared in xylene, and coverslipped. Cresyl violet staining was performed in every single section for the visualization of the hippocampal structure. Sections were processed and captured into images with Nikon Eclipse E800 microscope and Nikon FDX35 camera.

2.13. Statistical analysis

Results, reported as means \pm SEM, were analyzed with the SPSS package for Windows, version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). In experiments where two groups were compared, results were analyzed using Student's *t*-test. In experiments where four groups were compared, two-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test was used. Correlation studies between variables were studied by Pearson's correlation coefficient. In all cases, the significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. A β alters VGLUT1 expression and glutamate release in primary cell cultures

A significant decrease of VGLUT1 levels was observed in Tg2576 mice hippocampal primary cell culture when compared to wild type (Student's *t*-test, $p < 0.001$) (Figure 1a).

VGLUT1 has been reported to play a key role in the efficacy of glutamatergic synaptic transmission and consequently, the reduction of VGLUT1 levels in Tg2576 primary cell cultures resulted in a decreased glutamate release by those neurons

(Student's *t*-test, $p < 0.01$) (Figure S1). This could indicate glutamatergic neurotransmission impairment in Tg2576 neuronal cells.

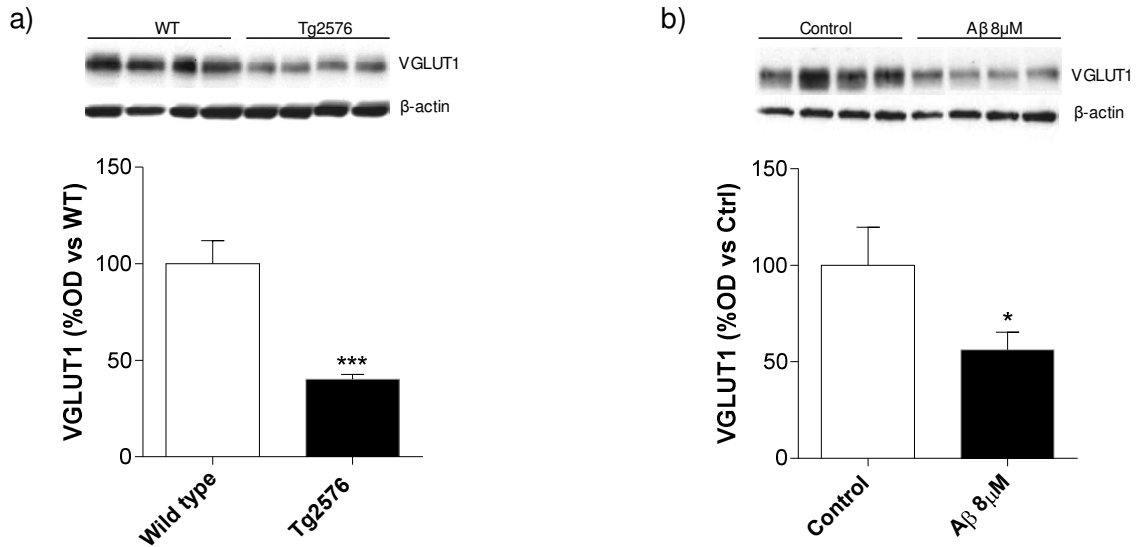


Figure 1. VGLUT1 protein levels in Tg2576 mice hippocampal primary cell cultures (panel a) and wild type primary cell cultures treated with 8 μ M of A β (panel b). In each panel, a representative picture of western blot is shown. Results are expressed as % optical density of wild type or control cells. β -actin is used as internal control. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. OD: optical density; WT: wild type; Ctrl: control.

To determine if A β is the responsible in the decrease of VGLUT1 levels, wild type mice hippocampal primary cell cultures were treated with 8 μ M A β . The A β ₁₋₄₂ was previously aggregated in order to obtain the highly toxic oligomer species. To study the oligomeric species formed in the incubation conditions used, western blot was performed and several bands corresponding to the different aggregation forms could be observed (Figure S2). The treatment resulted in a significant reduction of VGLUT1 protein expression (Student's *t*-test, $p < 0.05$), indicating an amyloid driven toxicity in glutamatergic terminals (Figure 1b).

3.2. A β alters VGLUT1 expression and cognitive function in Tg2576 mice

As depicted in Figure 2a, decreased expression of VGLUT1 protein was found in 8-months-old, as well as 16-months-old Tg2576 mice hippocampus when compared with wild type animals (Two way ANOVA, main effect of genotype, $F_{1,21}=8.887$, $p<0,01$; $n=6-7$). Moreover, soluble murine A β_{1-42} levels assessed by ELISA were found exponentially increased between 8 and 16 months of age (Student's t -test, $p<0.001$) (Figure 2b). Once again, this could suggest an important role of A β in the toxicity of glutamatergic neurotransmission measured by VGLUT1 levels.

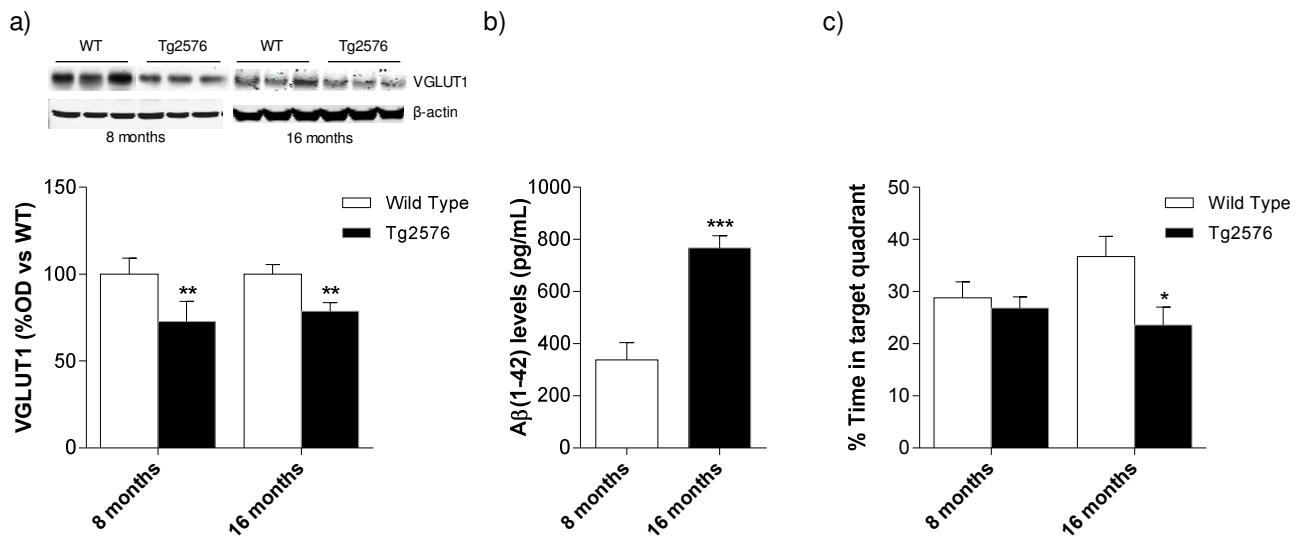


Figure 2. In panel a, VGLUT1 protein decrease in 8 and 16 months-old Tg2576 mice. A representative picture of western blot is shown. Results are expressed as % optical density of wild type mice. β -actin is used as internal control. ** $p<0.01$. In panel b, A β_{1-42} levels (pg/mL) in 8 and 16 months-old Tg2576 mice. *** $p<0.001$. In panel c, cognitive performance in the MWM retention phase of 8 and 16 months-old Tg2576 mice. Data are presented as % of time swam in the quadrant where platform used to be located. * $p<0.05$. OD: optical density; WT: wild type.

However, cognitive performance studied by MWM appeared to be intact in 8-months-old Tg2576 mice, while 16-months-old Tg2576 mice showed memory impairment in the same behavioral task (acquisition phase: Student's t -test, $p>0.05$ vs

wild type, data not shown; retention phase: Student's *t*-test, $p < 0.05$ vs wild type) (Figure 2c). Therefore, A β may lead to glutamatergic neurotoxicity also *in vivo*, but the decrease in glutamatergic neurotransmission is not sufficient to induce cognitive deficiencies, as 8 months mice did not appear cognitively impaired.

3.3. Increased amyloid pathology in AD brains is correlated to decreased VGLUT1 expression

The total number of cases analyzed was 16 controls (7 males/9 females) and 15 AD (5 males/10 females). No differences in age at death or brain pH were observed between controls and AD (6.28 ± 0.16 vs 6.44 ± 0.10 , Table S1).

As expected, a significant increase in senile plaques was found in the BA10 of AD brains compared to control (2.85 ± 0.15 vs 0.06 ± 0.22 ; Student's *t*-test; $p < 0.001$; $n = 15-16$; Table S1). Moreover, a significant increase in total A β_{1-42} peptide levels (33.7 ± 0.67 $\mu\text{mol/mg}$ vs 28.8 ± 1.7 $\mu\text{mol/mg}$; Student's *t*-test; $p < 0.001$) in AD brains compared to controls was observed (Table S1). VGLUT1 protein levels were significantly reduced in AD brains compared to controls (42.54 ± 6.65 vs 100.00 ± 12.44 ; Student's *t*-test; $p < 0.001$; Table S1).

A significant negative correlation was also observed between senile plaque and VGLUT1 expression (Pearson's, $r = -0.732$; $p < 0.01$) and between A β_{1-42} levels and VGLUT1 expression (Pearson's, $r = -0.654$; $p < 0.05$) (Figure 3). Notably, no correlation was found between VGLUT1 levels and cognitive status assessed by MMSE score (Pearson's, $r = -0.073$; $p > 0.05$).

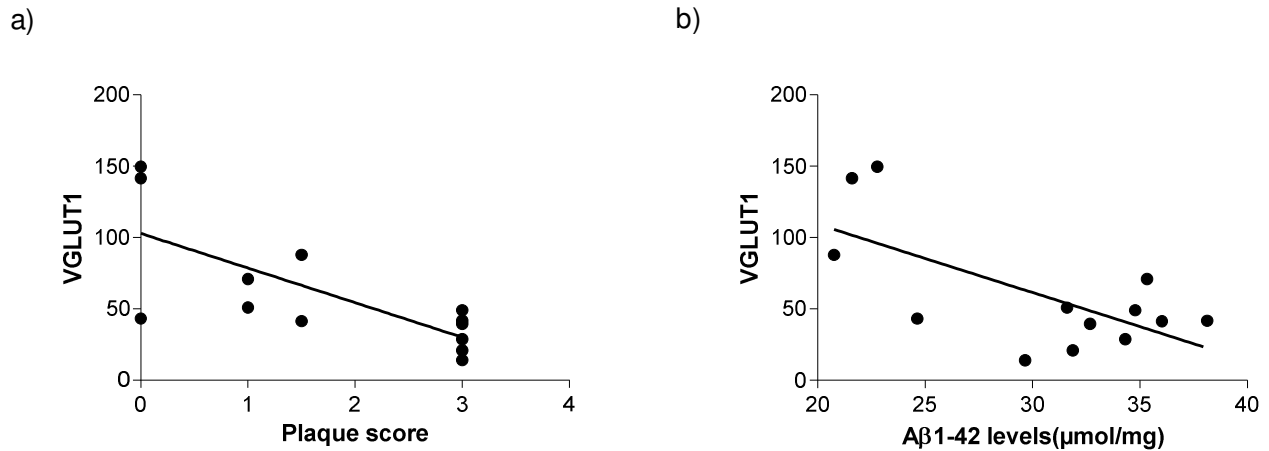


Figure 3. Negative correlation between senile plaque score and VGLUT1 expression (panel a; Pearson's, $p < 0.01$) and between A β_{1-42} (μ mol/mg) levels and VGLUT1 expression (panel b; Pearson's, $p < 0.05$) in human post-mortem AD and control brains.

3.4. Effect of A β on hippocampal plasticity in VGLUT1+/- mice

In order to assess if decreased VGLUT1 levels could protect or, in the contrary, worsen the neuronal toxicity induced by A β , A β_{1-42} species were icv injected into VGLUT1+/- mice brain.

One week after injection, using Nissl staining, no morphological changes in the hippocampus of wild type or VGLUT1+/- mice injected with A β were observed by gross examination (Figure 4a), indicating the absence of neuronal death in the injected brain region.

Changes in levels of synaptic markers were studied through synaptophysin, a presynaptic marker and PSD95, a postsynaptic marker, protein levels. Unchanged synaptophysin

levels were found (Two way ANOVA, $F_{1,20}=3.809$, $p > 0,05$; $n=5-7$) (Figure 4b); however, PSD95 protein levels were decreased in A β treated mice (Two way ANOVA, main effect of treatment, $F_{1,21}=22.26$, $p < 0,001$; $n=5-7$) (Figure 4c).

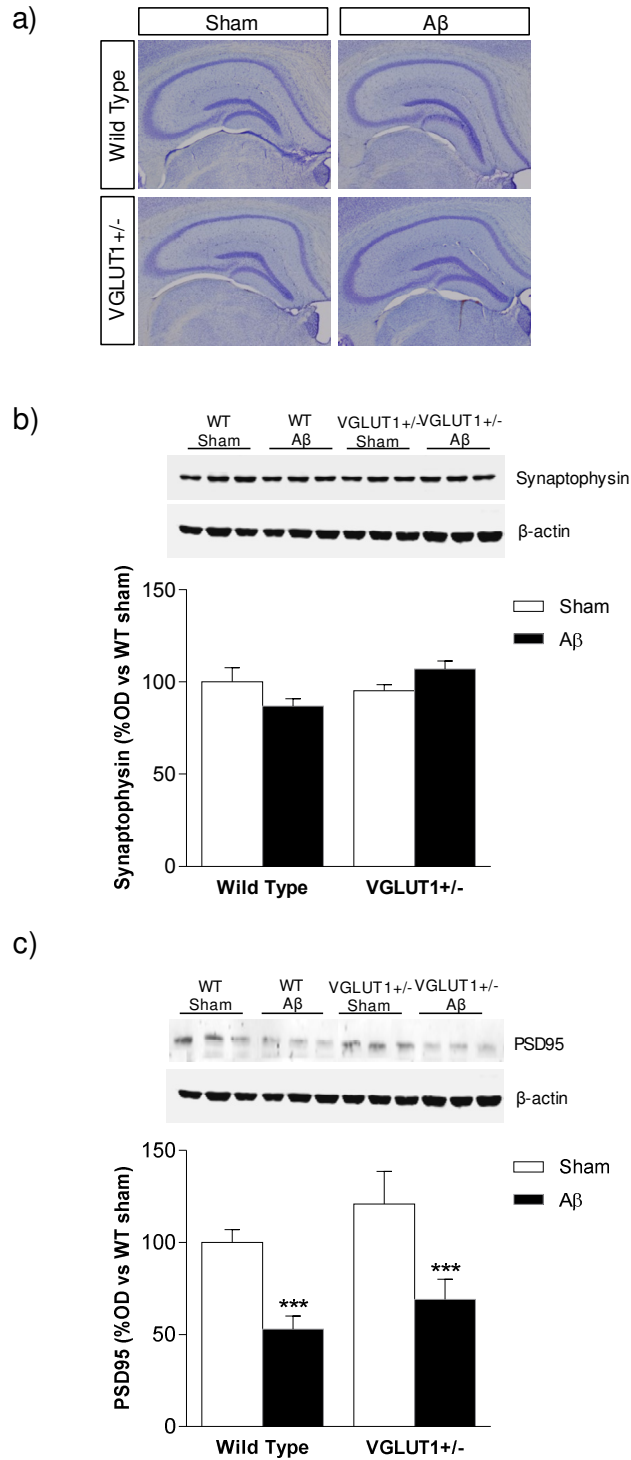


Figure 4. Effect of A β on hippocampal plasticity in VGLUT1^{+/-} mice. In panel **a**, Nissl staining. In panel **b**, synaptophysin (presynaptic marker) protein levels. In panel **c**, PSD95 (postsynaptic marker) protein levels. In panels **b** and **c**, a representative picture of western blot is shown. Results are expressed as % optical density of wild type sham. β -actin is used as internal control. *** $p < 0.001$. OD: optical density; WT: wild type.

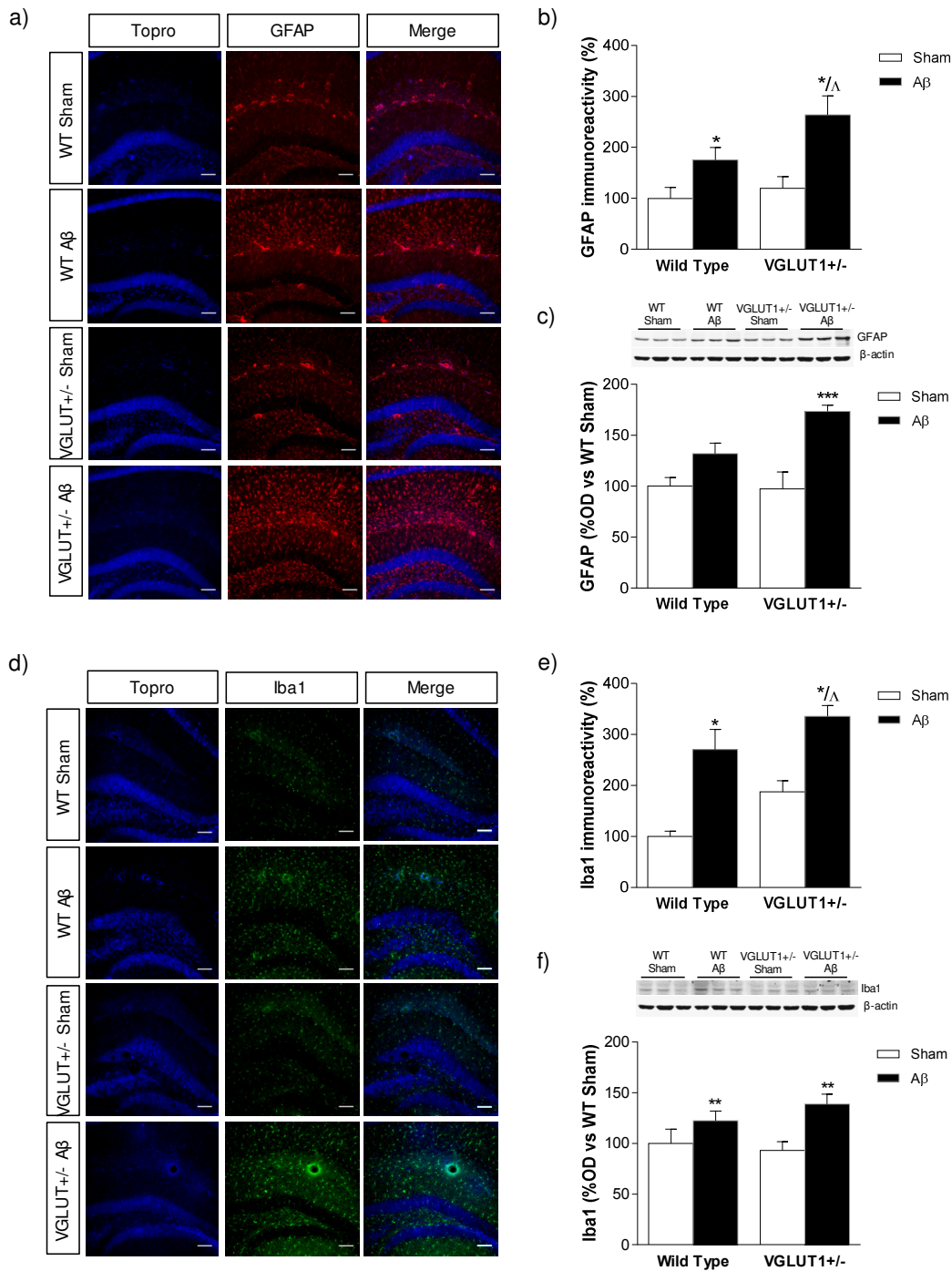


Figure 5. Effect of A β on neuroinflammation in VGLUT1^{+/-} mice. GFAP (astrocyte activation marker) immunostaining (scale bar 100 μ m) (panel a), its corresponding quantification (panel b) and protein levels measured by western blot (panel c). Iba1 (microglial activation marker) immunostaining (scale bar 100 μ m) (panel d), its corresponding quantification (panel e) and protein levels measured by western blot (panel f). In western blot experiments, a representative picture of western blot is shown. Results are expressed as % optical density of wild type sham. β -actin is used as internal control. * Main effect of treatment; Δ main effect of genotype. OD: optical density; WT: wild type.

Even though no apparent changes in hippocampal plasticity were found, as it has been described that chronic glial activation induced by A β is a key factor contributing to AD pathology, the impact of VGLUT1 decrease in the development of A β induced neuroinflammation was also studied. Neuroinflammation was assessed by GFAP and Iba1 protein levels, markers of astrocyte or microglial activation respectively.

As shown in figure 5a and 5b, GFAP was increased after A β administration but this increase was significantly higher in VGLUT1 \pm mice (two way ANOVA, main effect of treatment, $F_{1,14}=17.91$, $p<0,001$; $n=4-5$; main effect of genotype, $F_{1,14}=4.439$, $p<0,05$; $n=4-5$). When GFAP levels were analyzed through western blot technique a significant treatment \times genotype interaction was found (two-way ANOVA, $F_{1,21}=4.438$, $p<0.05$; $n=5-7$). Further analysis showed a significant increase in GFAP levels in VGLUT1 \pm -A β injected mice compared to the rest of the groups (Bonferroni; $p<0.001$) (Figure 5c). As depicted in figure 5d and 5e, Iba1 levels were increased after A β injection in wild type mice with a more pronounced increase in VGLUT1 \pm animals (two way ANOVA, main effect of treatment, $F_{1,14}=29.26$, $p<0,001$; $n=4-5$; main effect of genotype, $F_{1,14}=6.743$, $p<0,05$; $n=4-5$). Western blot analysis only showed that A β injected animals displayed higher Iba1 expression (two way ANOVA, main effect of treatment, $F_{1,21}=9.344$, $p<0,01$) (Figure 5f).

Interestingly, no increases in GFAP or Iba1 immunoreactivity were observed in the cortex of the experimental groups (Figure S3a and b).

Discussion

Although it is well recognized that the glutamatergic system is involved in the pathophysiology of AD, the role that the glutamatergic synapse may play is little understood. To shed more light on this phenomenon, in the present study we have attempted to analyze the susceptibility of glutamatergic terminals to A β induced toxicity and the impact that alterations of the glutamatergic neurotransmission could exert in the vulnerability to other deleterious processes associated to AD. Our study not only shows that A β induces a strong toxicity in glutamatergic nerve terminals, but demonstrates that even though increased glutamatergic toxicity associated to A β does not initially seem to be related to cognitive deficits, the decrease in VGLUT1 levels might exacerbate AD pathology, at least in part via increasing the vulnerability to A β induced neuroinflammation.

The present study shows that A β caused a loss of glutamatergic markers, reflecting a reduction of the number of glutamatergic nerve terminals in the hippocampus. Our results of decreased VGLUT1 in cell culture is in line with application of A β to human induced pluripotent stem cell-derived neurons led to a reduction in the VGLUT1 staining of vesicles in neurites (Nieweg et al. 2015). These data focusing on the evaluation of a neurochemical marker (VGLUT1), suggest that glutamatergic synapses are highly susceptible to dysfunction and damage in AD. Moreover, our data demonstrating a correlation between A β levels and plaque burden with the decrease of VGLUT1 in AD postmortem brains pinpoints the direct neurotoxic effect of A β on glutamatergic terminals.

Indeed, even though conflicting results were previously described the conclusion of this study is in line with several other studies that have suggested the involvement of glutamatergic dysfunction in early AD (Bell et al. 2006; Kirvell et al. 2006; Kashani

et al. 2008), and animal models of AD (Bell et al. 2006; Minkeviciene et al. 2008). This could be due to the tight interplay between formation (Cirrito et al. 2008) and accumulation of A β and the activity of glutamatergic synapses in AD models (Lacor et al. 2004; Sokolow et al. 2012). At similarity to our data, it has been also described an age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic mice model (Minkeviciene et al. 2008). Furthermore, several studies in different animal models of AD have demonstrated early dysfunctions of synaptic plasticity at hippocampal glutamatergic synapses (Oddo et al. 2003; Auffret et al. 2009), which result from an alteration of glutamatergic receptors in synapses (Hsieh et al. 2006; D'Amelio et al. 2011).

In accordance to our post-mortem data, several studies found no correlation with mental test scores in AD patients (Kirvell et al. 2006; Robinson et al. 2014). Therefore, although an increase in plaque pathology and glutamatergic synaptic loss may be early events associated with cognitive impairment, it has been established that hippocampal VGLUT1 expression is not a good marker of cognitive impairment in the oldest-old (Robinson et al. 2014). This idea is also supported by the fact that VGLUT1 \pm mice show no cognitive impairment in the MWM task (Tordera et al. 2007). In this line, in our hands, in 8 months Tg2576 mice, a reduction of VGLUT1 levels without cognitive deficiency was observed and only when animals reached the elderly (16 months) developed memory impairment. The fact that other authors found a correlation between glutamatergic markers and cognition can probably reflects the particular association of modifications of glutamatergic terminals with cognitive deficits, but based in our findings it remains to be elucidated if this is a causal relation or just a consequence of the greater relative abundance of glutamatergic terminals in cortical regions that make their alterations more evident upon memory impairment.

The lack of cognitive deficiency in early states of the disease in Tg2576 mice suggests also that apart from the putative dysfunction and the loss of glutamatergic synapses, another event is necessary to induce memory impairment. Therefore, in order to assess if reductions in glutamatergic neurotransmission could increase the neuronal toxicity, it was next studied if decreases in VGLUT1, even though not directly associated to cognitive deficits, could exacerbate other pathological events in the illness that could lead, on the long term, to cognitive disturbances.

Long term potentiation, an experimental indicator of synaptic plasticity, are impaired in plaque-bearing mice with AD and after A β peptide has been applied to brain slices (Walsh et al. 2005). Subsequent to this impairment, signaling molecules important to neuronal plasticity such as synaptophysin and PSD95 are decreased. In our experimental model, exogenous A β administration is not sufficient to induce cell death and the consequent morphological changes in the hippocampus, suggesting that the decrease in VGLUT1 protein levels does not increase the vulnerability to A β induced synaptic plasticity disruption. However, this lack of morphological changes does not preclude the idea that decreases in glutamatergic terminals could contribute to susceptibility to other insults, such as neuroinflammation.

Widespread neuroinflammation prominently accompanies neurotoxic peptides aggregation in AD brains. Activated microglia and reactive astrocytes localize to fibrillar plaques, and their biochemical markers are elevated in the brains of patients with AD (Wyss-Coray et al. 2002). In the present study, the significantly higher astrocyte and microglial activation found suggests that the decrease in VGLUT1 levels not only disrupts the glutamatergic signaling in AD brains, but also exacerbates and increases the vulnerability to A β induced neuroinflammation. Interestingly, no increases in GFAP or Iba1 immunoreactivity were observed in the cortex of any mice, suggesting

that icv injected A β_{1-42} could not diffuse to the cortex, resulting in an absence of neuroinflammation in that brain area. These data further support the hypothesis that lack of VGLUT1 is not enough, but it is rather necessary the concomitant insult of both decreased VGLUT+ A β to produce neuroinflammation.

In conclusion, the present study revealed a high susceptibility of glutamatergic nerve terminals to A β -induced neuroinflammation. The results obtained in this work reveal the importance of VGLUT1 in the progression of AD, as the decrease of this protein levels exacerbates A β induced neuroinflammation in the hippocampus, probably contributing to the development of cognitive impairments observed in the AD pathology.

Funding and disclosures

MRP is a recipient of a fellowship from FIS. This work was supported by a grant from FIS (13/00858). The authors declare no conflict of interest.

Supplementary data

Figure S1

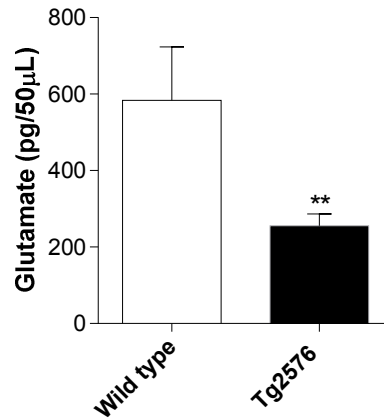


Figure S1. Glutamate release (pg/50 μ L) in Tg2576 hippocampal primary cell cultures. ** $p < 0.01$.

Figure S2

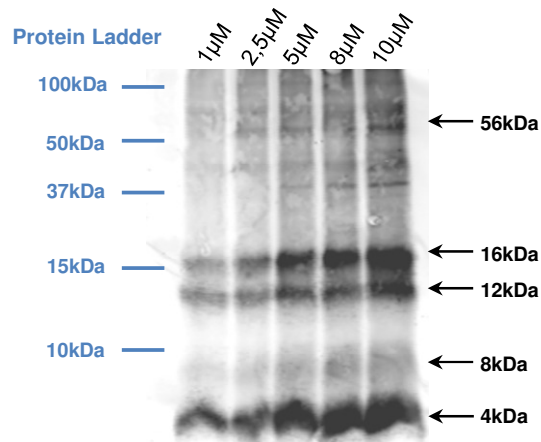


Figure S2. A β_{1-42} aggregation and toxic oligomer formation. To study the oligomeric species formed in the incubation conditions used, western blot was performed using the 6E10 antibody. Increasing concentrations of protein (1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 8 μ M and 10 μ M) were tested in order to be able to discriminate all the oligomeric species present in the sample. The bands under 10 kDa could correspond to the monomeric (4 kDa) and dimeric (8 kDa) forms of A β_{1-42} . Bands under and above 15 kDa correlate in size with A β_{1-42} in its trimeric (12 kDa) and tetrameric (16 kDa) forms. The band above 50 kDa is closed to the expected 56 kDa band of the dodecameric A β form (A β *56), currently considered as one of the more toxic oligomers of A β .

Figure S3

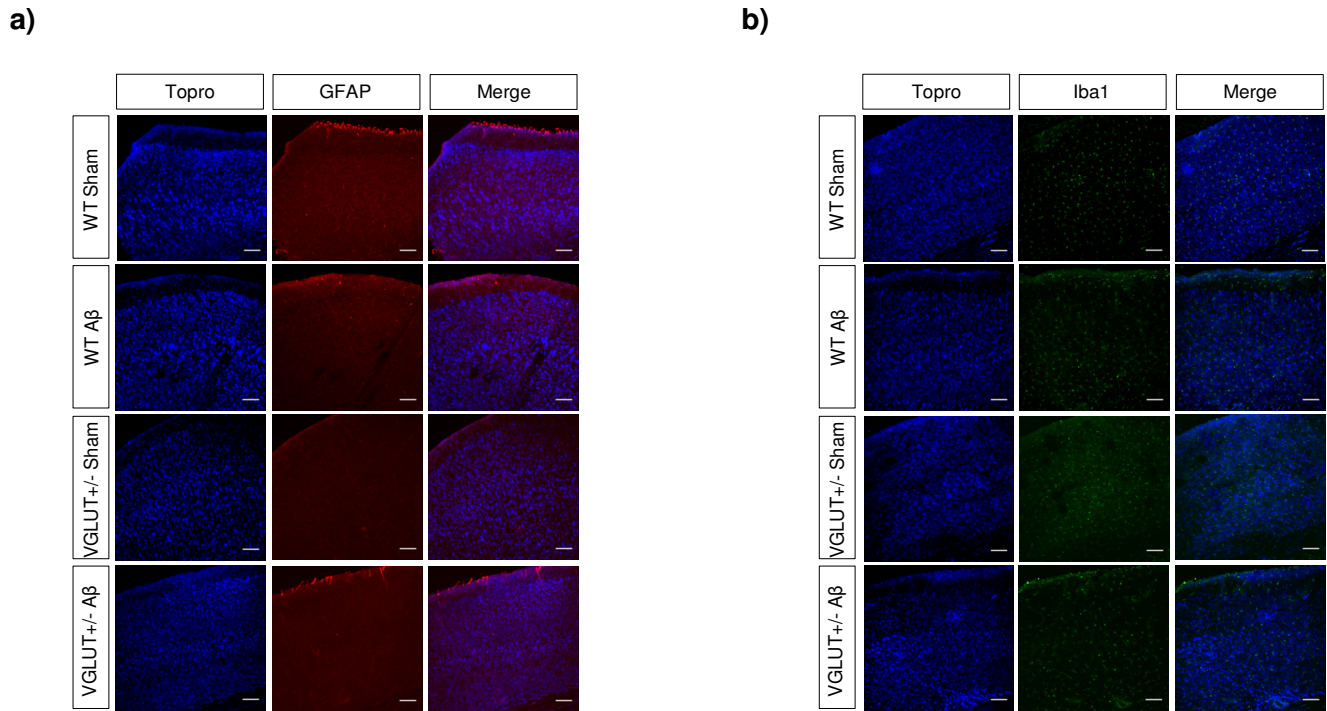


Figure S3. GFAP (panel a) and Iba (panel b) immunohistochemistry in the cortex of A β injected wild type and VGLUT1 $^{+/-}$ mice.

Table S1. Demographic and neuropathological features of control and patients with AD.

	Control	AD
Age	74.75 \pm 2.67	81.06 \pm 1.60
Gender (male/female)	11/9	11/12
pH	6.28 \pm 0.16	6.44 \pm 0.10
A β (μ mol/mg)	33.7 \pm 0.67	28.8 \pm 1.7
Plaque score	0.06 \pm 0.22	2.85 \pm 0.15
VGLUT1 (%OD vs Ctrl)	100.00 \pm 12.44	42.54 \pm 6.65

References

- Auffret, A., Gautheron, V., Repici, M., Kraftsik, R., Mount, H. T. J., Mariani, J. and Rovira, C.** 2009. «Age-Dependent Impairment of Spine Morphology and Synaptic Plasticity in Hippocampal CA1 Neurons of a Presenilin 1 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (32): 10144-52.
- Bell, K. F. S., Bennett, D. A., and Cuello, A. C.** 2007. «Paradoxical Upregulation of Glutamatergic Presynaptic Boutons during Mild Cognitive Impairment». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (40): 10810-17.
- Bell, K. F. S., and Cuello, A. C.** 2006. «Altered Synaptic Function in Alzheimer's Disease». *European Journal of Pharmacology* 545 (1): 11-21.
- Bellocchio, E. E., Reimer, R. J., Fremeau, R. T., and Edwards, R. H.** 2000. «Uptake of Glutamate into Synaptic Vesicles by an Inorganic Phosphate Transporter». *Science (New York, N.Y.)* 289 (5481): 957-60.
- Canas, P. M., Porciúncula, L. O., Cunha, G. M. A., Silva, C. G., Machado, N. J., Oliveira, J. M. A., Oliveira, C. R. and Cunha, R. A.** 2009. «Adenosine A2A Receptor Blockade Prevents Synaptotoxicity and Memory Dysfunction Caused by Beta-Amyloid Peptides via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (47): 14741-51.
- Cirrito, J. R., Kang, J. E., Lee, J., Stewart, F. R., Verges, D. K., Silverio, L. M., Bu, G., Mennerick, S. and Holtzman, D. M.** 2008. «Endocytosis Is Required for Synaptic Activity-Dependent Release of Amyloid-Beta in Vivo». *Neuron* 58 (1): 42-51.
- D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., Diamantini, A. et al.** 2011. «Caspase-3 Triggers Early Synaptic Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease». *Nature Neuroscience* 14 (1): 69-76.

- Danbolt**, N. C. 2001. «Glutamate Uptake». *Progress in Neurobiology* 65 (1): 1-105.
- Edwards.**, R. H. 2007. «The Neurotransmitter Cycle and Quantal Size». *Neuron* 55 (6): 835-58.
- Fagan**, A. M., Roe, C. M., Xiong, C., Mintun, M. A., Morris, J.C. and Holtzman D. M. 2007. «Cerebrospinal Fluid Tau/beta-amyloid(42) Ratio as a Prediction of Cognitive Decline in Nondemented Older Adults». *Archives of Neurology* 64 (3): 343-49.
- Folstein**, M. F., Folstein, S. E. and McHugh, P. R. 1975. «“Mini-Mental State”. A Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician». *Journal of Psychiatric Research* 12 (3): 189-98.
- Garcia-Garcia**, A. L., Elizalde, N., Matrov, D., Harro, J., Wojcik, S. M., Venzala, E., Ramírez, M. J., Del Rio, J. and Tordera, R. M. 2009. «Increased Vulnerability to Depressive-like Behavior of Mice with Decreased Expression of VGLUT1». *Biological Psychiatry* 66 (3): 275-82.
- Hardy**, J. and Selkoe, D. J. 2002. «The Amyloid Hypothesis of Alzheimer’s Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics». *Science* 297 (5580): 353-56.
- Hsiao**, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. and Cole, G. 1996. «Correlative Memory Deficits, Abeta Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice». *Science* 274 (5284): 99-102.
- Hsieh**, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S. and Malinow., R. 2006. «AMPA Removal Underlies Abeta-Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss». *Neuron* 52 (5): 831-43.
- Ikonomovic**, M. D., Mufson, E. J., Wu, J., Cochran, E. J., Bennett, D. A. and DeKosky, S. T. 2003. «Cholinergic Plasticity in Hippocampus of Individuals with Mild Cognitive Impairment: Correlation with Alzheimer’s Neuropathology». *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 5 (1): 39-48.

Jacobsen, J. S., Wu, C. C., Redwine, J. M., Comery, T. A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R. et al. 2006. «Early-Onset Behavioral and Synaptic Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (13): 5161-66.

Kashani, A., Lopicard, E., Poirel, O., Videau, C., David, J. P., Fallet-Bianco, C., Simon, A. et al. 2008. «Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the Prefrontal Cortex Is Correlated with Cognitive Decline in Alzheimer Disease». *Neurobiology of Aging* 29 (11): 1619-30.

Kirvell, S. L., Esiri, M. and Francis, P. T. 2006. «Down-Regulation of Vesicular Glutamate Transporters Precedes Cell Loss and Pathology in Alzheimer's Disease». *Journal of Neurochemistry* 98 (3): 939-50.

Kirvell, S. L., Elliott, M. S., Kalaria, R. N., Hortobágyi, T., Ballard, C. G. and Francis, P. T. 2010. «Vesicular Glutamate Transporter and Cognition in Stroke: A Case-Control Autopsy Study». *Neurology* 75 (20): 1803-9.

Knafo, S., Alonso-Nanclares, L., Gonzalez-Soriano, J., Merino-Serrais, P., Fernaud-Espinosa, I., Ferrer, I. and DeFelipe, J. 2009. «Widespread Changes in Dendritic Spines in a Model of Alzheimer's Disease». *Cerebral Cortex* 19 (3): 586-92.

Koffie, R. M., Hashimoto, T., Tai, H. C., Kay, K. R., Serrano-Pozo, A., Joyner, D., Hou, S. et al. 2012. «Apolipoprotein E4 Effects in Alzheimer's Disease Are Mediated by Synaptotoxic Oligomeric Amyloid-B». *Brain: A Journal of Neurology* 135 (Pt 7): 2155-68.

Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L., Fernandez, S. J., Gong, Y., Viola, K. L., Lambert, M. P. et al. 2004. «Synaptic Targeting by Alzheimer's-Related Amyloid Beta Oligomers». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (45): 10191-200.

Lai, M. K., Lai, O. F., Keene, J., Esiri, M. M., Francis, P. T., Hope, T. and Chen, C. P. 2001. «Psychosis of Alzheimer's Disease Is Associated with Elevated Muscarinic M2 Binding in

the Cortex». *Neurology* 57 (5): 805-11.

Lawlor, P. A. and Young, D. 2011. «A β Infusion and Related Models of Alzheimer Dementia». En *Animal Models of Dementia*, editado por Peter Paul De Deyn y Debby Van Dam, 48:347-70. Totowa, NJ: Humana Press./

Lewis, D. A. 2002. «The Human Brain Revisited: Opportunities and Challenges in Postmortem Studies of Psychiatric Disorders». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 26 (2): 143-54.

Masliah, E., Alford, M., Mallory, M., Rockenstein, E., Moechars, D., and Van Leuven, F. 2000. «Abnormal Glutamate Transport Function in Mutant Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice». *Experimental Neurology* 163 (2): 381-87.

Mesulam, M. 2004. «The Cholinergic Lesion of Alzheimer's Disease: Pivotal Factor or Side Show?». *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 11 (1): 43-49.

Minkeviciene, R., Ihalainen, J., Malm, T., Matilainen, O., Keksa-Goldsteine, V., Goldsteins, G., Iivonen, H. et al. 2008. «Age-Related Decrease in Stimulated Glutamate Release and Vesicular Glutamate Transporters in APP/PS1 Transgenic and Wild-Type Mice». *Journal of Neurochemistry* 105 (3): 584-94.

Mucke, L. E., Masliah, Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K. and McConlogue, L. 2000. «High-Level Neuronal Expression of Abeta 1-42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaque Formation». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (11): 4050-58.

Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K. L., Davies, P., Greengard, P., and Buxbaum, J. D. 2000. «Correlation between Elevated Levels of Amyloid Beta-Peptide in the Brain and Cognitive Decline». *JAMA* 283 (12): 1571-77.

Nieweg, K., Andreyeva, A., van Stegen, B., Tanriöver, G. and Gottmann, K. 2015.

«Alzheimer's Disease-Related Amyloid-B Induces Synaptotoxicity in Human iPS Cell-Derived Neurons». *Cell Death & Disease* 6: e1709.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y. and LaFerla, F. M. 2003. «Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular Abeta and Synaptic Dysfunction». *Neuron* 39 (3): 409-21.

Palop, J. J., Chin, J., Roberson, E. D., Wang, J., Thwin, M. T., Bien-Ly, N., Yoo, J. et al. 2007. «Aberrant Excitatory Neuronal Activity and Compensatory Remodeling of Inhibitory Hippocampal Circuits in Mouse Models of Alzheimer's Disease». *Neuron* 55 (5): 697-711.

Proctor, D. T., Coulson, E. J. and Dodd, P. R. 2010. «Reduction in Post-Synaptic Scaffolding PSD-95 and SAP-102 Protein Levels in the Alzheimer Inferior Temporal Cortex Is Correlated with Disease Pathology». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 21 (3): 795-811.

Robinson, J. L., Molina-Porcel, L., Corrada, M. M., Raible, K., Lee, E. B., Lee, V.Y., Kawas, C. H. and Trojanowski, J. Q. 2014. «Perforant Path Synaptic Loss Correlates with Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease in the Oldest-Old». *Brain: A Journal of Neurology* 137 (Pt 9): 2578-87.

Rudinskiy, N., Hawkes, J. M., Betensky, R.A., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Spires-Jones, T. L. and Hyman, B. T. 2012. «Orchestrated Experience-Driven Arc Responses Are Disrupted in a Mouse Model of Alzheimer's Disease». *Nature Neuroscience* 15 (10): 1422-29.

Rupsingh, R., Borrie, M., Smith, M., Wells, J. L. and Bartha, R. 2011. «Reduced Hippocampal Glutamate in Alzheimer Disease». *Neurobiology of Aging* 32 (5): 802-10.

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». *Neurobiology of Aging* 27 (10): 1372-84.

Selkoe, D. J. 2008. «Soluble Oligomers of the Amyloid Beta-Protein Impair Synaptic

Plasticity and Behavior». *Behavioural Brain Research* 192 (1): 106-13.

Sokolow, S., Luu, S. H., Nandy, K., Miller, C. A., Vinters, H. V., Poon, W. W. and Gylys, K. H. 2012. «Preferential Accumulation of Amyloid-Beta in Presynaptic Glutamatergic Terminals (VGLUT1 and VGLUT2) in Alzheimer's Disease Cortex». *Neurobiology of Disease* 45 (1): 381-87.

Solas, M., Aisa, B., Mugueta, M.C., Del Río, J., Tordera, R. M. and Ramírez, M. J. 2010. «Interactions between Age, Stress and Insulin on Cognition: Implications for Alzheimer's Disease». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35 (8): 1664-73.

Sze, C. I., Bi, H., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Filley, C. M. and Martin, L. J. 2000. «Selective Regional Loss of Exocytotic Presynaptic Vesicle Proteins in Alzheimer's Disease Brains». *Journal of the Neurological Sciences* 175 (2): 81-90.

Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., and Jahn, R.. 2000. «Identification of a Vesicular Glutamate Transporter That Defines a Glutamatergic Phenotype in Neurons». *Nature* 407 (6801): 189-94.

Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N, DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A. and Katzman, R. 1991. «Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer's Disease: Synapse Loss Is the Major Correlate of Cognitive Impairment». *Annals of Neurology* 30 (4): 572-80.

Tordera, R. M., Totterdell, S., Wojcik, S. M., Brose, N., Elizalde N., Lasheras, B. and Del Rio, J. 2007. «Enhanced Anxiety, Depressive-like Behaviour and Impaired Recognition Memory in Mice with Reduced Expression of the Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGLUT1)». *The European Journal of Neuroscience* 25 (1): 281-90.

Walsh, D. M., Townsend, M., Podlisny, M. B., Shankar, G. M., Fadeeva, J. V., El Agnaf, O., Hartley, D. M. and Selkoe, D. J. 2005. «Certain Inhibitors of Synthetic Amyloid Beta-Peptide

(Abeta) Fibrillogenesis Block Oligomerization of Natural Abeta and Thereby Rescue Long-Term Potentiation». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (10): 2455-62.

Wyss-Coray, T. and Mucke, L. 2002. «Inflammation in Neurodegenerative Disease--a Double-Edged Sword». *Neuron* 35 (3): 419-32.

CAPÍTULO VI
DISCUSIÓN GENERAL

La EA es una enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta por deterioro cognitivo acompañado de trastornos conductuales. Debido al mayor envejecimiento de la población mundial, la EA se ha convertido, a día de hoy, en uno de los grandes problemas sanitarios de la sociedad actual. En la actualidad, el tratamiento farmacológico de la EA sólo está dirigido al tratamiento sintomático de la enfermedad y no se dispone de tratamientos curativos.

Es ampliamente aceptado que la EA es consecuencia de una compleja interacción entre genes y otros factores de riesgo. Entre esos factores de riesgo se encuentran la diabetes, la obesidad, o el síndrome metabólico. Es de señalar que hay un proceso patogénico que puede subyacer a todos ellos: la resistencia a la insulina. Hay una fuerte evidencia epidemiológica que indica que la insulino-resistencia está asociada a un incremento del riesgo relativo de padecer EA (Barbagallo et al. 2014, Ma et al. 2015).

La analogía entre alteraciones de la señalización de insulina y EA ha sido tal que se ha llegado a describir como “diabetes tipo 3” (Steen et al. 2005). Es decir, no sólo se daría una continua alteración de la señalización de la insulina a nivel periférico sino también a nivel central. Esa alteración en la señalización de la insulina podría cambiar la producción eficiente de energía cerebral impulsada por la glucosa a una producción menos eficiente impulsada por los cuerpos cetónicos (Yao et al. 2011). Cabe destacar además que, recientemente se ha descubierto que los cuerpos cetónicos, actuando sobre transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT), ejercen un papel inhibitorio en la liberación de glutamato (Juge et al. 2010).

A la vista de estos antecedentes, la hipótesis principal de este trabajo fue estudiar si las alteraciones periféricas metabólicas causadas por estas alteraciones en la señalización de insulina pudieran estar asociadas a perturbaciones neuroquímicas en la EA, y en concreto en la neurotransmisión glutamatérgica. Por lo tanto, el fin del presente trabajo fue estudiar cómo

los mecanismos promovidos por alteraciones en la señalización de insulina, tales como el aumento en la producción de cuerpos cetónicos, podrían contribuir al déficit glutamatérgico, y demostrar si todo ello podría contribuir a la aparición del déficit cognitivo observado en la EA.

1. Comprobar las alteraciones en la señalización de insulina en la EA

1.1. Estudio de la señalización de insulina en cerebros post-mortem.

Diversos autores apuntan que la diabetes aumenta el riesgo de padecer demencia o AD hasta en un 65% (Profenno et al. 2010; Ohara et al. 2011; Barbagallo et al. 2014). En la misma línea, otros estudios muestran que en enfermos de EA los niveles de insulina en plasma son altos y en LCR bajos, ya en estadíos iniciales de la EA (Craft et al. 1998; Gil-Bea et al. 2010) y que además dichos pacientes presentan un deterioro de la sensibilidad periférica a la insulina (Hoyer et al. 1991; de la Monte, 2012). Todo ello podría conducir a una alteración en la señalización de la insulina no sólo a nivel periférico pero también a nivel central. En general, la sensibilidad a la insulina cerebral se asocia con los procesos cognitivos superiores, de manera que un deterioro en el funcionamiento de la insulina implica una peor ejecución en tareas de aprendizaje y memoria tanto en ratas (Lannert et al. 1998) como en humanos (Craft et al. 2003; Craft et al. 1998).

Se ha demostrado también que la insulina puede modular la plasticidad sináptica (Biessels et al. 1996; Biessels et al. 1998). Además la insulina regula el metabolismo y acumulación de A β a través de la enzima IDE (Farris et al. 2003; Qiu et al. 2006) y de Tau a través de GSK3 β (Kim et al. 2012), protegiendo al cerebro de la formación de placas de amiloide y ovillos neurofibrilares, considerados los marcadores neuropatológicos de EA.

Numerosos estudios apoyan la hipótesis de que una mejora en la sensibilidad de la señalización de insulina, aumenta el rendimiento cognitivo. Entre esos estudios se encuentran la administración intranasal crónica de insulina en individuos no dementes y con EA (Benedict et al. 2007; Hallschmid et al. 2008; Reger et al. 2008; Sabayan et al. 2008; Benedict et al. 2011), la administración de insulina aguda en pacientes con EA (Kopf et al. 1996; Craft et al. 1996; Kern et al. 2001; Craft et al. 2003; Craft et al. 2012; Blázquez et al. 2014) o la administración de antidiabéticos, sensibilizadores de la insulina o secretagogos, como la familia de las meglitinidas, metformina, tiazolidinedionas, agonistas del receptor del péptido-1 glucagonoide (GLP-1) entre otros, en pacientes con EA (Watson et al. 2005; Li et al. 2015).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran que los cerebros postmortem de AD muestran signos de una señalización de insulina alterada, incluyendo la reducción en la expresión de los IR cerebrales así como una disminución en su casacada de señalización intracelular. Esto podría deberse al hecho cada vez más aceptado de que la acumulación de oligómeros A β y su unión a las sinapsis pueden conducir a la eliminación de IRs de la membrana plasmática neuronal (De Felice, 2013) y conducir a una alteración en la señalización insulínica. A su vez, las alteraciones en la casacada intracelular de la insulina podrían estar relacionadas con los déficits cognitivos observados en la EA, ya que la activación de la cascada de transducción de señal de la insulina (PI3K / Akt / ERK) es esencial para la inducción de la potenciación a largo plazo, un proceso básico subyacente al aprendizaje y la memoria (Sui et al. 2008).

1.2. Análisis del efecto de la insulino-resistencia periférica inducida por dieta sobre la señalización de insulina a nivel central.

Con el fin de investigar más a fondo los eventos moleculares subyacentes que vinculan el metabolismo energético del cerebro y el desarrollo de la EA, se ha elegido para el presente trabajo un enfoque experimental bien establecido para inducir resistencia a la insulina en los órganos periféricos de roedores que consta en un tratamiento con una dieta alta en grasa (HFD), lo que da lugar a obesidad (Prieto-Hontoria et al. 2009; Moreno-Aliaga et al. 2011; Arnold et al. 2014). En nuestras manos, el tratamiento con HFD produjo no sólo perturbaciones metabólicas periféricas (incluyendo hiperinsulinemia o resistencia a la insulina), sino también alteraciones en la señalización de insulina central. La unión de la insulina a la subunidad alfa extracelular del IR inicia una serie de autofosforilaciones en residuos tirosina de la subunidad beta, activando la actividad tirosina quinasa intracelular hacia la fosforilación de IRS, permitiendo así que estas moléculas adaptadoras interactúen con un gran número de dianas. Una vez activados, tanto IRS1 y como IRS2 están posteriormente regulados a través de un mecanismo muy complejo que involucra múltiples cinasas serina/treonina (Ser/Thr), que pueden fosforilar las regiones finales de las moléculas del IRS en más de 50 residuos de Ser/Thr. Por lo tanto, las alteraciones en la señalización de insulina en la EA podrían estar asociados a defectos en el propio IR (Pessin et al. 2000) o pueden ser mediados a través de la regulación negativa de IRS. El IRS activado recluta a la PI3K, activando así la cascada de señalización que implica a AKT. Nuestros datos demuestran que el tratamiento con HFD puede disminuir la fosforilación y consiguiente activación del IR, IRS o AKT, resultados que están en línea con los publicados anteriormente en relación con exámenes de cerebros post-mortem de pacientes humanos que sufren de EA y diabetes (Liu et al. 2011)

Ha sido sugerido que el defecto de la función del receptor de insulina neuronal se correlaciona con el deterioro cognitivo (Greenwood et al. 2005; Moloney et al. 2010), como se demuestra en el presente trabajo por el déficit en el rendimiento en la prueba de memoria del reconocimiento de nuevo objeto (NORT) mostrado por el grupo HFD y tal y como ha sido descrito previamente (Wang et al. 2015). En un trabajo reciente (Petrov et al. 2015), se ha demostrado que la administración de HFD desde el momento del destete es suficiente para producir déficits de memoria dependientes de hipocampo en los ratones APP^{swe}/PS1^{dE9}, un modelo murino de EA familiar bien establecido que presenta alteraciones cognitivas desde los 6 meses de edad.

Las deficiencias en la señalización de la insulina podrían conducir a deficiencias en el metabolismo energético, lo que conlleva un aumento del estrés oxidativo, la activación de citoquinas proinflamatorias y la disfunción bioenergética mitocondrial (Rivera et al. 2005; de la Monte et al. 2005; Soscia et al. 2006; de la Monte et al. 2006). Colectivamente, esto resulta en un cambio en el perfil metabólico del cerebro, pasando desde un perfil bioenergético basado en la obtención de energía desde la glucosa hacia una vía compensatoria, pero menos eficiente, como es la vía cetogénica (Yao et al. 2011), hecho que parece ocurrir en estadios iniciales de la EA (Yao et al. 2009) y tal y como ha sido demostrado en el presente trabajo en los animales sometidos a HFD. Las dietas ricas en grasas y bajas en carbohidratos promueven la formación de cuerpos cetónicos, principalmente en la matriz mitocondrial de las células del hígado, que luego se exportan a otros órganos para cubrir las demandas de energía (Vidali et al. 2015). Cabe destacar que la obesidad inducida por la dieta puede alterar la estructura de la BHE, de manera que el origen del aumento de los niveles de cuerpos cetónicos observados en el hipocampo de los animales en estudio en el presente trabajo, podría ser la periferia.

1.3. Investigación de los posibles mecanismos causantes de las alteraciones en la señalización de insulina en la EA: papel de la quinasa JNK.

La activación de JNK podría estar relacionada con las alteraciones en las vías de la insulina observadas en la EA través de la inhibición de IRS-1 (De Felice, 2013), y se ha demostrado que la supresión de la vía de JNK mejora la resistencia a la insulina y tolerancia a la glucosa (Li et al. 2013). En apoyo de esta idea, se ha descubierto que la administración de un inhibidor de JNK es capaz de revertir la resistencia a la insulina y los déficits cognitivos en un modelo de resistencia a la insulina inducida mediante la administración de corticosterona crónica (Solas et al. 2013).

Tal y como ha sido analizado en punto anterior de la presente discusión, las deficiencias en la señalización de la insulina podrían conducir a deficiencias en el metabolismo de la energía con aumentos en la producción de cuerpos cetónicos. Curiosamente, se ha sugerido que el exceso de los niveles de cuerpos cetónicos regula la actividad de los VGLUTs y pueden bloquear la liberación de glutamato (Juge et al. 2010). Por lo tanto, es posible especular que las deficiencias en la señalización de insulina podrían cambiar el metabolismo para producir cuerpos cetónicos, que a su vez, podrían llegar al cerebro y conducir a una disminución de expresión de VGLUT1, con la consiguiente disminución de la liberación de glutamato y, por tanto, conduciendo al déficit glutamatérgico descrito en la EA. En el trabajo de Solas et al. (2013) se ha demostrado que la inhibición de JNK revierte las alteraciones de la insulina. Además en el presente trabajo hemos demostrado que esa inhibición de JNK se traduce en la reversión de las deficiencias glutamatérgicas (recuperando los niveles de VGLUT1), apoyando nuestra hipótesis de que JNK puede servir como un enlace crucial entre las enfermedades metabólicas y los déficits glutamatérgicos.

2. Estudiar si las alteraciones en la señalización de insulina centrales están asociadas al deterioro glutamatérgico en la EA.

2.1 Expresión de VGLUT1 en cerebros post-mortem y en el modelo de insulino-resistencia inducido por dieta.

Es sabido que los VGLUTs neuronales requieren glucosa para su función óptima (Ikemoto et al. 2003) y, tal y como ya ha sido previamente comentado, se ha sugerido que el exceso de los niveles de cuerpos cetónicos podría regular la actividad de VGLUTs y podrían bloquear la liberación de glutamato (Juge et al. 2010). Por lo tanto, es posible especular y ha quedado evidenciado en el presente trabajo que las deficiencias en la señalización de insulina podrían cambiar el metabolismo para producir cuerpos cetónicos que a su vez, podrían conducir a una disminución de expresión de VGLUT1, y por lo tanto a una menor liberación de glutamato. Curiosamente, algunos autores han demostrado que la baja regulación de los transportadores de glutamato vesicular precede a la pérdida de células y la patología en la EA (Kirvell et al. 2006) y que la pérdida de VGLUT1 en la corteza prefrontal está correlacionada con el deterioro cognitivo en esta enfermedad (Kashani et al. 2008). Los resultados en cerebros post-mortem del presente estudio van en la línea de estos antecedentes ya que confirman que una alteración en la cascada de insulina (como se ha expuesto en el punto 1.1. de la presente discusión) en los cerebros afectados por la EA se acompañan de una disminución en la expresión de VGLUT1. La hipótesis de que una mayor producción de cuerpos cetónicos derivada de un estado de resistencia a insulina puede disminuir los niveles de VGLUT1 queda reforzada también por los resultados obtenidos en los animales sometidos a HFD, en los que se han encontrado menores niveles de dicho transportador vesicular de glutamato.

2.2 Descenso en la liberación de glutamato asociada a menores niveles de VGLUT1.

Apoyando a nuestra hipótesis, los datos presentados en este trabajo muestran que el aumento de las concentraciones de 3- β -hidroxibutirato conduce a una reducción concentración dependiente de la liberación de glutamato en cultivos primarios neuronales. Los VGLUTs neuronales requieren glucosa para su función óptima (Ikemoto et al. 2003) y ha sido demostrado que la adición de 3- β hidroxibutirato al medio celular (en presencia de glucosa), reduce los niveles de glutamato en cultivos neuronales (Lund et al. 2009) y que la respuesta del receptor NMDA a Ca^{+2} se ve comprometida en presencia de 3- β hidroxibutirato (Lund et al. 2014). En base a estos antecedentes, la suplementación de la dieta con los cuerpos cetónicos se ha utilizado para el tratamiento de patologías centrales, tales como la epilepsia, asociados al aumento del tono excitador.

3. Estudiar la relación entre resistencia a la insulina, A β y expresión de VGLUT1.

Aunque es ampliamente sabido que el sistema glutamatérgico está implicado en la fisiopatología de la EA, el papel que las sinapsis glutamatérgicas pueden jugar en la patología es poco conocido. Para arrojar más luz sobre este fenómeno, en el presente estudio hemos tratado de analizar la susceptibilidad de las terminales glutamatérgicas a la toxicidad inducida por A β y el impacto que las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica podrían ejercer sobre la vulnerabilidad a otros procesos nocivos asociados a la EA. Nuestro estudio no sólo muestra que A β induce una fuerte toxicidad en las terminales nerviosas glutamatérgicas, sino que demuestra además que a pesar de que el aumento de la toxicidad glutamatérgica asociada a A β no parece inicialmente estar relacionada con déficits cognitivos, la disminución en los niveles de VGLUT1 podría exacerbar la patología de la EA, al menos en parte mediante el aumento de la vulnerabilidad a la neuroinflamación inducida por A β .

3.1 Estudio del efecto de A β sobre las terminales glutamatérgicas.

El último estudio del presente trabajo (capítulo 5) confirma que el A β es capaz de causar una pérdida de marcadores glutamatérgicos, lo que refleja una reducción del número de terminales nerviosas glutamatérgicas en el hipocampo. Nuestros resultados de disminución de VGLUT1 en cultivo celular están en consonancia con estudios previos en los que la aplicación de A β a las neuronas derivadas de células madre pluripotentes llevan a una reducción en la tinción de VGLUT1 en las vesículas de las neuritas (Nieweg et al. 2015). Estos datos centrados en la evaluación de un marcador neuroquímico (VGLUT1), sugieren que las sinapsis glutamatérgicas son altamente susceptibles a la disfunción y el daño en la EA. Por otra parte, nuestros datos demuestran una correlación entre los niveles de A β y/o la cantidad de placas de amiloide con la disminución de VGLUT1 en cerebros postmortem de EA lo que subraya el efecto neurotóxico directo de A β sobre las terminales glutamatérgicas. De hecho, a pesar de que en la literatura podemos hallar resultados conflictivos en relación a este tema, la conclusión de este estudio está en consonancia con otros estudios que han sugerido la implicación de la disfunción glutamatérgica en estadios iniciales de EA (Bell et al. 2006; Kirvell et al. 2006; Kashani et al. 2008), así como en modelos animales de la EA (Bell et al. 2006; Minkeviciene et al. 2008). Esto podría ser debido a la estrecha interacción entre formación de A β y la actividad de las sinapsis glutamatérgicas (Lacor et al. 2004; Cirrito et al. 2008; Sokolow et al. 2012). En similitud con nuestros datos, se ha descrito también una disminución dependiente de la edad en la liberación de glutamato y los niveles de transportador de glutamato vesicular en el modelo de ratón transgénico APP/PS1 (Minkeviciene et al. 2008). Además, varios estudios en diferentes modelos animales de la EA han demostrado disfunciones en las sinapsis glutamatérgicas del hipocampo en estadios iniciales de enfermedad (Oddo et al. 2003; Auffret et al. 2009), que son resultado de una

alteración de los receptores glutamatérgicos en esas sinapsis (Hsieh et al. 2006; D'Amelio et al. 2011).

De acuerdo con nuestros datos post-mortem, varios estudios no han encontrado ninguna correlación entre los niveles de VGLUT1 y los resultados obtenidos en las pruebas mentales (reflejo del estado cognitivo) en pacientes con EA (Kirvell et al. 2006; Robinson et al. 2014). Por lo tanto, aunque un aumento en la patología amiloide y la pérdida sináptica glutamatérgica pueden ser eventos tempranos asociados con el déficit cognitivo, queda establecido que la expresión de VGLUT1 en el hipocampo no es un buen marcador del deterioro cognitivo (Robinson et al. 2014). Esta idea es apoyada también por el hecho de que los ratones adultos (3 meses) deficientes para VGLUT1 (VGLUT1^{+/-}) no muestran problemas de aprendizaje y memoria en el test del laberinto acuático de Morris (Tordera et al. 2007). En esta línea, según nuestros resultados, en los ratones Tg2576 de 8 meses de edad, se observó una reducción de los niveles de VGLUT1 sin deficiencia cognitiva y sólo cuando los animales alcanzaron la vejez (16 meses) mostraron un deterioro de la memoria. El hecho de que otros autores hayan encontrado una correlación entre los marcadores glutamatérgicos y la cognición, probablemente pueda reflejar la asociación particular entre las modificaciones de las terminales glutamatérgicas y los déficits cognitivos, pero basado en nuestros hallazgos queda por dilucidar si ésto se trata de una relación causal o simplemente una consecuencia de la abundancia de terminales glutamatérgicas en regiones corticales que hacen que sus alteraciones sean más evidentes con el deterioro de la memoria.

3.2 Influencia de las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica sobre otros mecanismos deletéreos en la EA

La falta de déficits cognitivos observados en estadios tempranos de la enfermedad en ratones Tg2576 sugiere también que, aparte de la disfunción y la pérdida de sinapsis glutamatérgicas, otro evento es necesario para inducir el deterioro de la memoria. Por lo tanto, a fin de evaluar si las reducciones en la neurotransmisión glutamatérgica podrían aumentar la toxicidad neuronal, se estudió si las disminuciones en VGLUT1, aunque no se asocien directamente a déficits cognitivos, podrían exacerbar otros eventos patológicos de la enfermedad que podrían conducir, a largo plazo, a trastornos cognitivos.

La LTP es un indicador de plasticidad sináptica que aparece dañado en ratones portadores de placas de amiloide y en cortes cerebrales a los que se ha añadido el péptido A β (Walsh et al. 2005). Posteriores a este deterioro, las moléculas principales de señalización de plasticidad neuronal, como sinaptofisina y PSD95 disminuyen. En nuestro modelo experimental (ratones VGLUT+/- administrados con A β icv), la administración exógena de A β no fue suficiente para inducir la muerte celular y los consiguientes cambios morfológicos en el hipocampo, lo que sugiere que la disminución en los niveles de proteína VGLUT1 no aumenta la vulnerabilidad a la interrupción de plasticidad sináptica inducida por A β . Sin embargo, esta falta de cambios morfológicos no es incompatible con la idea de que la disminución en las terminales glutamatérgicas podría contribuir a la susceptibilidad a otras agresiones, como la neuroinflamación.

La neuroinflamación generalizada acompaña a los péptidos neurotóxicos agregados en los cerebros con EA. Los astrocitos reactivos y la microglía activada se co-localizan con las placas seniles y sus marcadores bioquímicos están elevados en el cerebro de pacientes que sufren la patología (Wyss-Coray et al. 2002). En el presente estudio, la activación significativamente mayor de astrocitos y microglía hallada sugiere que la disminución en los

niveles de VGLUT1 no sólo interrumpe la señalización glutamatérgica en cerebros con EA, sino que también exacerba y aumenta la vulnerabilidad a la neuroinflamación inducida por A β . Sin embargo, no se observaron aumentos en la inmunoreactividad de GFAP o Iba1 en la corteza de los ratones, lo que sugiere que el A β inyectado no pudo difundir a la corteza, lo que resulta en una ausencia de neuroinflamación en ese área cerebral. Estos datos apoyan la hipótesis de que la falta de VGLUT1 no es suficiente, pero es necesario el efecto concomitante de niveles disminuidos de VGLUT1 y el aumento de A β para producir la neuroinflamación.

En conclusión, el presente estudio reveló una alta susceptibilidad de las terminales nerviosas glutamatérgicas a daños inducidos por A β . Los resultados obtenidos en este trabajo revelan la importancia de VGLUT1 en la progresión de la EA, ya que la disminución de los niveles de esta proteína exacerba la neuroinflamación inducida por A β en el hipocampo, probablemente contribuyendo al desarrollo de deficiencias cognitivas observadas en la patología de la EA.

4. Investigar el efecto del ácido lipoico, un tratamiento capaz de revertir o prevenir la resistencia a la insulina sobre la transmisión glutamatérgica.

Como último objetivo del presente trabajo, se sugirió que los tratamientos capaces de revertir las alteraciones de la vía de la insulina podrían ser candidatos potenciales para el tratamiento de la EA. El ácido lipoico (AL) es un ácido graso de cadena corta de origen natural, presente en plantas y animales. Se ha demostrado que la reducción de los niveles endógenos de AL aumenta el estrés oxidativo, que, a su vez, conduce a una mayor resistencia a la insulina, la disfunción mitocondrial, y la inflamación. Por otra parte, la expresión del gen AL sintasa se ve disminuida en modelos animales de diabetes y obesidad tanto en músculo esquelético como en tejido adiposo (Padmalayam et al. 2009). Por lo tanto, el AL ha sido

propuesto como un posible nuevo enfoque terapéutico para enfermedades inflamatorias crónicas como la diabetes. Nuestros datos muestran claramente que la suplementación dietética con AL impide tanto las alteraciones periféricas como centrales en la señalización de la insulina y la elevación de los cuerpos cetónicos tras el tratamiento con HFD, apoyando la idea de la capacidad del AL para contrarrestar el desarrollo de la resistencia a la insulina, incluso bajo esta condición obesogénica. No sólo esto, sino que además la administración de AL revierte los déficits cognitivos en animales sometidos a HFD, lo que podría deberse a la normalización de los niveles y la función de VGLUT1 (recuperación de la neurotransmisión glutamatérgica). En línea con el presente estudio se ha descrito que un estado hipermetabólico en un modelo murino triple transgénico de EA de 7 meses de edad puede ser revertido mediante la administración de AL (Sancheti et al. 2014). Esta capacidad del AL para prevenir la resistencia a la insulina en ratas HFD podría estar relacionado, al menos en parte, a la estimulación de AMPK (Prieto-Hontoria et al. 2013). Por lo tanto, el AL mediante la reversión de las anormalidades metabólicas asociadas a la obesidad y la resistencia a la insulina podría ser considerado un potencial nuevo fármaco para el tratamiento de los trastornos cognitivos y neuroquímicos de la EA.

5. Conclusión general

En definitiva, los resultados del presente proyecto podrían ayudar no sólo a una mejor comprensión de los mecanismos comunes subyacentes que podrían vincular a la diabetes y la EA, sino también a considerar nuevas opciones terapéuticas. En un campo de investigación que aún espera avances sustanciales en las opciones terapéuticas, la idea de la EA como un tipo de diabetes mellitus cerebral está siendo traducida a ensayos clínicos con resultados preliminares prometedores y se considera hoy en día que la gestión eficaz de la diabetes podría prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad. Con todo ello, la modulación de la

actividad de VGLUT1 podría ser considerada una posible diana terapéutica para el tratamiento de trastornos metabólicos y cognitivos de la EA.

Referencias:

- Arnold**, S. E., Lucki, I., Brookshire, B. R., Carlson, G. C., Browne, C. A., Kazi, H., Bang, S. et al. 2014. «High Fat Diet Produces Brain Insulin Resistance, Synaptodendritic Abnormalities and Altered Behavior in Mice». *Neurobiology of Disease* 67 (July): 79-87.
- Auffret**, A., Gautheron, V., Repici, M., Kraftsik, R., Mount, H. T. J., Mariani, J. and Rovira, C. 2009. «Age-Dependent Impairment of Spine Morphology and Synaptic Plasticity in Hippocampal CA1 Neurons of a Presenilin 1 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (32): 10144-52.
- Barbagallo**, M., and Dominguez, L. J. 2014. «Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease». *World Journal of Diabetes* 5 (6): 889-93.
- Bell**, K. F. S., and Cuello, A. C. 2006. «Altered Synaptic Function in Alzheimer's Disease». *European Journal of Pharmacology* 545 (1): 11-21.
- Benedict**, C., Frey, W. H., Schiöth, H. B., Schultes, B., Born, J. and Hallschmid, M. 2011. «Intranasal Insulin as a Therapeutic Option in the Treatment of Cognitive Impairments». *Experimental Gerontology* 46 (2-3): 112-15.
- Benedict**, C., Hallschmid, M., Schultes, B., Born, J. and Kern, W. 2007. «Intranasal Insulin to Improve Memory Function in Humans». *Neuroendocrinology* 86 (2): 136-42.
- Biessels**, G. J., Kamal, A., Ramakers, G. M., Urban, I. J., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W. and Gispen, W. H. 1996. «Place Learning and Hippocampal Synaptic Plasticity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats». *Diabetes* 45 (9): 1259-66.
- Biessels**, G. J., Kamal, A., Urban, I.J., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W. and Gispen, W. H. 1998. «Water Maze Learning and Hippocampal Synaptic Plasticity in Streptozotocin-Diabetic Rats: Effects of Insulin Treatment». *Brain Research* 800 (1): 125-35.
- Blázquez**, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V., and Ruiz-Albusac, J. M. 2014. «Insulin in

the Brain: Its Pathophysiological Implications for States Related with Central Insulin Resistance, Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease». *Frontiers in Endocrinology* 5: 161.

Cirrito, J. R., Kang, J. E., Lee, J., Stewart, F. R., Verges, D. K., Silverio, L. M., Bu, G., Mennerick, S. and Holtzman, D. M. 2008. «Endocytosis Is Required for Synaptic Activity-Dependent Release of Amyloid-Beta in Vivo». *Neuron* 58 (1): 42-51.

Craft, S., Newcomer, J., Kanne, S., Dagogo-Jack, S., Cryer, P., Sheline, Y., Luby, J., Dagogo-Jack, A. and Alderson, A. 1996. «Memory Improvement Following Induced Hyperinsulinemia in Alzheimer's Disease». *Neurobiology of Aging* 17 (1): 123-30.

Craft, S., Peskind, E., Schwartz, M. W., Schellenberg, G. D., Raskind, M. and Porte, D. 1998. «Cerebrospinal Fluid and Plasma Insulin Levels in Alzheimer's Disease: Relationship to Severity of Dementia and Apolipoprotein E Genotype». *Neurology* 50 (1): 164-68.

Craft, S., Asthana, S., Cook, D. G., Baker, L. D., Cherrier, M., Purganan, K., Wait, C. et al. 2003. «Insulin Dose-Response Effects on Memory and Plasma Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease: Interactions with Apolipoprotein E Genotype». *Psychoneuroendocrinology* 28 (6): 809-22.

Craft, S., Baker, L. D., Montine, T. J., Minoshima, S., Watson, G. S., Claxton, A., Arbuckle, M. et al. 2012. «Intranasal Insulin Therapy for Alzheimer Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment: A Pilot Clinical Trial». *Archives of Neurology* 69 (1): 29-38.

D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., Diamantini, A. et al. 2011. «Caspase-3 Triggers Early Synaptic Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease». *Nature Neuroscience* 14 (1): 69-76.

De Felice, F. G. 2013. «Alzheimer's Disease and Insulin Resistance: Translating Basic Science into Clinical Applications». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (2): 531-39.

De la Monte, S.M. 2012. «Brain Insulin Resistance and Deficiency as Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease». *Current Alzheimer Research* 9 (1): 35-66.

De la Monte, S.M., and Wands, J. R.. 2005. «Review of Insulin and Insulin-like Growth Factor Expression, Signaling, and Malfunction in the Central Nervous System: Relevance to Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 7 (1): 45-61.

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». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 9 (2): 167-81.

Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E. A., Frosch, M. P., Eckman, C. B., Tanzi, R. E., Selkoe, D. J. and Guenette, S. 2003. «Insulin-Degrading Enzyme Regulates the Levels of Insulin, Amyloid Beta-Protein, and the Beta-Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain in Vivo». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 4162-67.

Gil-Bea, F. J., Solas, M., Solomon, A., Mugueta, C., Winblad, B., Kivipelto, M., Ramirez, M. J. and Cedazo-Mínguez, A. 2010. «Insulin Levels Are Decreased in the Cerebrospinal Fluid of Women with Prodromal Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 22 (2): 405-13.

Greenwood, C. E., and Winocur, G. 2005. «High-Fat Diets, Insulin Resistance and Declining Cognitive Function». *Neurobiology of Aging* 26 Suppl 1 (December): 42-45.

Hallschmid, M., Benedict, C., Schultes, B., Born, J. and Kern, W. 2008. «Obese Men Respond to Cognitive but Not to Catabolic Brain Insulin Signaling». *International Journal of Obesity (2005)* 32 (2): 275-82.

Hoyer, S., Nitsch, R., and Oesterreich, K. 1991. «Predominant Abnormality in Cerebral Glucose Utilization in Late-Onset Dementia of the Alzheimer Type: A Cross-Sectional Comparison against Advanced Late-Onset and Incipient Early-Onset Cases». *Journal of Neural Transmission. Parkinson's Disease and Dementia Section* 3 (1): 1-14.

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S. and Malinow, R. 2006.

«AMPA Removal Underlies Abeta-Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss». *Neuron* 52 (5): 831-43.

Ikemoto, A., Bole, D. G. and Ueda, T. 2003. «Glycolysis and Glutamate Accumulation into Synaptic Vesicles. Role of Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase and 3-Phosphoglycerate Kinase». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (8): 5929-40.

Juge, N., Gray, J. A., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., Uneyama, H., Edwards, R. H., Nicoll, R. A. and Moriyama, Y. 2010. «Metabolic Control of Vesicular Glutamate Transport and Release». *Neuron* 68 (1): 99-112.

Kashani, A., Lepicard, E., Poirel, O., Videau, C., David, J. P., Fallet-Bianco, C., Simon, A. et al. 2008. «Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the Prefrontal Cortex Is Correlated with Cognitive Decline in Alzheimer Disease». *Neurobiology of Aging* 29 (11): 1619-30.

Kern, W., Peters, A., Fruehwald-Schultes, B., Deininger, E., Born, J. and Fehm, H. L. 2001. «Improving Influence of Insulin on Cognitive Functions in Humans». *Neuroendocrinology* 74 (4): 270-80.

Kim, B., and Feldman, E. L. 2012. «Insulin Resistance in the Nervous System». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 23 (3): 133-41.

Kirvell, S. L., Esiri, M. and Francis, P. T. 2006. «Down-Regulation of Vesicular Glutamate Transporters Precedes Cell Loss and Pathology in Alzheimer's Disease». *Journal of Neurochemistry* 98 (3): 939-50.

Kopf, S. R., and Baratti, C. M. 1996. «Effects of Posttraining Administration of Glucose on Retention of a Habituation Response in Mice: Participation of a Central Cholinergic Mechanism». *Neurobiology of Learning and Memory* 65 (3): 253-60.

Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L., Fernandez, S. J., Gong, Y., Viola, K. L., Lambert, M. P. et al. 2004. «Synaptic Targeting by Alzheimer's-Related Amyloid Beta Oligomers». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (45):

10191-200.

Lannert, H. and Hoyer, S. 1998. «*Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin causes long-term diminutions in Learning and Memory abilities and in Cerebral Energy Metabolism in Adult Rats*». *Behavioural Neurosciences* 112 (5):1199-208.

Liu, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. and Gong, C. X. 2011. «Deficient Brain Insulin Signalling Pathway in Alzheimer's Disease and Diabetes». *The Journal of Pathology* 225 (1): 54-62.

Li, X., Song, D. and Leng, S. X. 2015. «Link between Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease: From Epidemiology to Mechanism and Treatment». *Clinical Interventions in Aging* 10: 549-60.

Lund, T. M., Ploug, K. B., Iversen, A., Jensen, A. A. and Jansen-Olesen, Inger. 2014. «The Metabolic Impact of B-Hydroxybutyrate on Neurotransmission: Reduced Glycolysis Mediates Changes in Calcium Responses and KATP Channel Receptor Sensitivity». *Journal of Neurochemistry*, October.

Lund, T. M., Risa, O., Sonnewald, U., Schousboe, A. and Waagepetersen, H. S. 2009. «Availability of Neurotransmitter Glutamate Is Diminished When Beta-Hydroxybutyrate Replaces Glucose in Cultured Neurons». *Journal of Neurochemistry* 110 (1): 80-91.

Ma, L., Wang, J. and Li, Yun. 2015. «Insulin Resistance and Cognitive Dysfunction». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 444 (February): 18-23.

Minkeviciene, R., Ihalainen, J., Malm, T., Matilainen, O., Keksa-Goldsteine, V., Goldsteins, G., Iivonen, H. et al. 2008. «Age-Related Decrease in Stimulated Glutamate Release and Vesicular Glutamate Transporters in APP/PS1 Transgenic and Wild-Type Mice». *Journal of Neurochemistry* 105 (3): 584-94.

Moloney, A. M., Griffin, R. J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R. and O'Neill, O. 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): 224-43.

Moreno-Aliaga, M. J., Pérez-Echarri, N., Marcos-Gómez, B., Larequi, E., Gil-Bea, F. J., Violette, B., Gimenez, I., Martínez, J. A., Prieto, J. and Bustos, M.. 2011. «Cardiotrophin-1 Is a Key Regulator of Glucose and Lipid Metabolism». *Cell Metabolism* 14 (2): 242-53.

Nieweg, K., Andreyeva, A., van Stegen, B., Tanriöver, G. and Gottmann, K. 2015. «Alzheimer's Disease-Related Amyloid-B Induces Synaptotoxicity in Human iPS Cell-Derived Neurons». *Cell Death & Disease* 6: e1709.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y. and LaFerla, F. M. 2003. «Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular Abeta and Synaptic Dysfunction». *Neuron* 39 (3): 409-21.

Ohara, T., Doi, Y., Ninomiya, T., Hirakawa, Y., Hata, J., Iwaki, T., Kanba, S., and Kiyohara, Y. 2011. «Glucose Tolerance Status and Risk of Dementia in the Community: The Hisayama Study». *Neurology* 77 (12): 1126-34.

Padmalayam, I., Hasham, S., Saxena, U., and Pillarisetti, S. 2009. «Lipoic Acid Synthase (LASY): A Novel Role in Inflammation, Mitochondrial Function, and Insulin Resistance». *Diabetes* 58 (3): 600-608.

Pessin, J. E., and Saltiel, A. R. 2000. «Signaling Pathways in Insulin Action: Molecular Targets of Insulin Resistance». *The Journal of Clinical Investigation* 106 (2): 165-69.

Petrov, D., Pedrós, I., Artiach, G., Sureda, F. X., Barroso, E., Pallàs, M., Casadesús, G. et al. 2015. «High-Fat Diet-Induced Deregulation of Hippocampal Insulin Signaling and Mitochondrial Homeostasis Deficiencies Contribute to Alzheimer Disease Pathology in Rodents». *Biochimica Et Biophysica Acta*, May.

Prieto-Hontoria, P.L., Pérez-Matute, P., Fernández-Galilea, M., Martínez, J. A. and Moreno-Aliaga, M. J. 2013. «Effects of Lipoic Acid on AMPK and Adiponectin in Adipose Tissue of

Low- and High-Fat-Fed Rats». *European Journal of Nutrition* 52 (2): 779-87.

Prieto-Hontoria, P.L., Pérez-Matute, P., Fernández-Galilea, Barber., A., M., Martínez, J. A. and Moreno-Aliaga, M. J. 2009. «Lipoic Acid Prevents Body Weight Gain Induced by a High Fat Diet in Rats: Effects on Intestinal Sugar Transport». *Journal of Physiology and Biochemistry* 65 (1): 43-50.

Profenno, L. A., Porsteinsson, A. P. and Faraone, S.V. 2010. «Meta-Analysis of Alzheimer's Disease Risk with Obesity, Diabetes, and Related Disorders». *Biological Psychiatry* 67 (6): 505-12.

Qiu, W. Q. and Folstein, M. F. 2006. «Insulin, Insulin-Degrading Enzyme and Amyloid-Beta Peptide in Alzheimer's Disease: Review and Hypothesis». *Neurobiology of Aging* 27 (2): 190-98.

Reger, M. A., Watson, G. S., Green, P. S., Wilkinson, C. W., Baker, L. D., Cholerton, B., Fishel, M. A. et al. 2008. «Intranasal Insulin Improves Cognition and Modulates Beta-Amyloid in Early AD». *Neurology* 70 (6): 440-48.

Rivera, E. J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J. R. and 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: JAD* 8 (3): 247-68.

Robinson, J. L., Molina-Porcel, L., Corrada, M. M., Raible, K., Lee, E. B., Lee, V.Y., Kawas, C. H. and Trojanowski, J. Q. 2014. «Perforant Path Synaptic Loss Correlates with Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease in the Oldest-Old». *Brain: A Journal of Neurology* 137 (Pt 9): 2578-87.

Sabayan, B., Foroughinia, F., Mowla, A. and Borhanhaghghi., A. 2008. «Role of Insulin Metabolism Disturbances in the Development of Alzheimer Disease: Mini Review». *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias* 23 (2): 192-99.

Sancheti, H., Kanamori, K., Patil, I., Brinton, R. D., Ross, B. D. and Cadenas, E. 2014. «Reversal of Metabolic Deficits by Lipoic Acid in a Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease: A ¹³C NMR Study». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34 (2): 288-96.

Sokolow, S., Luu, S. H., Nandy, K., Miller, C. A., Vinters, H. V., Poon, W. W. and Gylys, K. H. 2012. «Preferential Accumulation of Amyloid-Beta in Presynaptic Glutamatergic Terminals (VGluT1 and VGluT2) in Alzheimer's Disease Cortex». *Neurobiology of Disease* 45 (1): 381-87.

Solas, M., Gerenu, G., Gil-Bea, F. J. and Ramírez, M. J. 2013. «Mineralocorticoid Receptor Activation Induces Insulin Resistance through c-Jun N-Terminal Kinases in Response to Chronic Corticosterone: Cognitive Implications». *Journal of Neuroendocrinology* 25 (4): 350-56.

Soscia, S. J., Tong, M., Xu, X. J., Cohen, A. C., Chu, J., Wands, J. R. and de la Monte, S. M. 2006. «Chronic Gestational Exposure to Ethanol Causes Insulin and IGF Resistance and Impairs Acetylcholine Homeostasis in the Brain». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63 (17): 2039-56.

Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Xu, R. T., Xu, J., Wands, K. R. and 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: JAD* 7 (1): 63-80.

Sui, L., Wang, J. and Li, B-M. 2008. «Role of the Phosphoinositide 3-Kinase-Akt-Mammalian Target of the Rapamycin Signaling Pathway in Long-Term Potentiation and Trace Fear Conditioning Memory in Rat Medial Prefrontal Cortex». *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 15 (10): 762-76.

Tordera, R. M., Totterdell, S., Wojcik, S. M., Brose, N., Elizalde N., Lasheras, B. and Del Rio, J. 2007. «Enhanced Anxiety, Depressive-like Behaviour and Impaired Recognition Memory in Mice with Reduced Expression of the Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGLUT1)». *The European Journal of Neuroscience* 25 (1): 281-90.

Vidali, S., Aminzadeh, S., Lambert, B., Rutherford, T., Sperl, W., Kofler, B. and Feichtinger, R. G. 2015. «Mitochondria: The Ketogenic Diet-A Metabolism-Based Therapy». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 63 (junio): 55-59.

Walsh, D. M., Townsend, M., Podlisny, M. B., Shankar, G. M., Fadeeva, J. V., El Agnaf, O., Hartley, D. M. and Selkoe, D. J. 2005. «Certain Inhibitors of Synthetic Amyloid Beta-Peptide (Abeta) Fibrillogenesis Block Oligomerization of Natural Abeta and Thereby Rescue Long-Term Potentiation». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (10): 2455-62.

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». *Cellular and Molecular Neurobiology*, May.

Watson, G. S., Cholerton, B. A., Reger, M. A., Baker, L. D., Plymate, S. R., Asthana, S., Fishel, M. A. et al. 2005. «Preserved Cognition in Patients with Early Alzheimer Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment during Treatment with Rosiglitazone: A Preliminary Study». *The American Journal of Geriatric Psychiatry: Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 13 (11): 950-58.

Wyss-Coray, T. and Mucke, L. 2002. «Inflammation in Neurodegenerative Disease--a Double-Edged Sword». *Neuron* 35 (3): 419-32.

Yao, J., Irwin, R.W., Zhao, L., Nilsen, J., Hamilton, R. T. and Brinton, R. D. 2009. «Mitochondrial Bioenergetic Deficit Precedes Alzheimer's Pathology in Female Mouse Model of Alzheimer's Disease». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America 106 (34): 14670-75.

Yao, J., Rettberg, J.R., Klosinski, L.P., Cadenas, E. and Brinton, R. D. 2011. «Shift in Brain Metabolism in Late Onset Alzheimer's Disease: Implications for Biomarkers and Therapeutic Interventions». *Molecular Aspects of Medicine* 32 (4-6): 247-57.

CAPÍTULO VII
CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten deducir las siguientes conclusiones:

1. En muestras de post-mortem de cerebros de EA se ha mostrado una insulino resistencia central, como queda reflejado en una disminución en los niveles de ARNm de receptor de insulina (IR) y menor expresión de pAKT y pERK2.
2. El modelo de insulino resistencia ambiental (inducido por dieta alta en grasas) muestra una insulino resistencia tanto periférica (niveles altos de cuerpos cetónicos periféricos y alto índice HOMA) y central (expresión disminuida de IR, IRS-1 y pAKT).
3. Tanto en cerebros humanos postmortem de EA como en un modelo experimental de insulina-resistencia se demostró que la expresión de VGLUT1, marcador de terminales glutamatérgicas, se encontraba disminuida.
4. El tratamiento con cuerpos cetónicos ha demostrado disminuir la liberación de glutamato en cultivos primarios de una forma dependiente de concentración. Estos resultados sugieren que la elevación en los niveles de cuerpos cetónicos asociado a una situación de insulina-resistencia promueve la disminución tanto en la expresión VGLUT1 como en la liberación de glutamato, pudiendo contribuir al déficit glutamatérgico en la EA.
5. En muestras cerebrales de EA, se observó un aumento de actividad de JNK asociada a las alteraciones en la señalización de la insulina. En un modelo experimental de insulina-resistencia, el inhibidor específico de JNK (D-JNKi-1) revirtió la disminución de VGLUT1.

6. En modelos de alta concentración del péptido β -amiloide, como son cultivos primarios de Tg2576 ó en cultivos primarios *wild type* tratados con $A\beta_{1-42}$ se observó una disminución en la expresión de VGLUT1 y una menor liberación de glutamato. En muestras humanas de corteza de cerebros de EA, también se ha visto una disminución en la expresión de VGLUT1 que se correlaciona estadísticamente con el incremento en los niveles de $A\beta_{1-42}$ y placas seniles. Este descenso en la expresión de VGLUT1 no se correlacionado con el deterioro cognitivo, medido mediante el MMSE.

7. En el modelo experimental de EA Tg2576 caracterizado por patología amiloide se observa una disminución en los niveles de VGLUT1 a los 8 meses de edad que no se acompaña de deterioro cognitivo en la prueba del laberinto acuático de Morris. Estos resultados sugieren que inicialmente esta pérdida de terminales glutamatérgicos no parece ser determinante para el desarrollo de déficits cognitivos en la EA.

8. La administración de $A\beta$ a ratones VGLUT1+/- provocó una mayor reactividad microglial y astrocítica (utilizando los marcadores Iba1 y GFAP) en hipocampo. Estos datos sugieren que la pérdida de VGLUT1 podría aumentar la sensibilidad del hipocampo a posteriores agresiones.

9. La suplementación de ácido lipoico en dieta revirtió el déficit cognitivo asociado al modelo experimental de insulina-resistencia, disminuyó la expresión de marcadores de insulina-resistencia periférica (índice HOMA y niveles de insulina) y central (pIR, pAKT, pERK), revirtió el aumento de los niveles de cuerpos cetónicos (plasmáticos e hipocampales) y aumentó la expresión de VGLUT1. Por lo tanto, se propone que ácido lipoico pudiera ser un potencial tratamiento para revertir estados subyacentes de insulina-resistencia y alteraciones en la expresión de VGLUT1 en la EA.

10. Los resultados obtenidos en la realización de este trabajo apoyan la idea de que en una situación de insulino-resistencia, el metabolismo cambia hacia la producción de cuerpos cetónicos que, al actuar sobre el VGLUT1, podría potenciar el déficit glutamatérgico en la EA. La insulino-resistencia pudiera estar relacionada con la acción del A β sobre el receptor de insulina. Aunque inicialmente este deterioro glutamatérgico no parece estar directamente relacionado con el deterioro cognitivo en la EA, la disminución de la expresión de VGLUT1 pudieran facilitar otros mecanismo patológicos, como es la neuroinflamación, y es esta conjunción compleja de factores lo que podría desembocar en un déficit cognitivo asociado a la EA.

CHAPTER VII
CONCLUSIONS

1. In AD postmortem brain samples central insulin resistance was observed, as reflected by decreased expression of insulin receptor (IR) mRNA and reduced pAKT and pERK2 protein levels.
2. High fat diet induced insulin resistance model showed both peripheral (assessed by high levels of peripheral ketone bodies and high HOMA index) as well as central insulin resistance (assessed by decreased expression of IR, IRS-1 and pAKT and high levels of ketone bodies).
3. Both in postmortem human brains of AD and in an experimental model of insulin resistance, the glutamatergic terminal marker VGLUT1 expression was diminished.
4. Treatment with ketone bodies decreased glutamate release in primary cell cultures in a concentration dependent manner. These results suggest that elevated levels of ketone bodies associated with an insulin resistance situation promotes decreases in VGLUT1 expression and glutamate release, contributing to the glutamatergic deficits observed in AD.
5. In AD brain samples, increased JNK activity associated with alterations in insulin signaling was observed. In an experimental model of insulin resistance, the specific JNK inhibitor (D-JNKi-1) reversed the central alterations in insulin signaling markers as well as the decreases in VGLUT1 levels.

6. In high β -amyloid peptide level models, such as Tg2576 mice primary cell culture or wild type mice primary cell cultures treated with $A\beta_{1-42}$, decreased VGLUT1 expression and reduced glutamate release was observed. In human AD brain cortex samples, it has been also observed a decrease in VGLUT1 expression which correlated statistically with increased levels of $A\beta_{1-42}$ and senile plaques. This decrease in VGLUT1 expression did not correlate with cognitive decline, measured by MMSE.
7. In Tg2576 mice, an experimental AD model characterized by amyloid pathology, a decrease in VGLUT1 levels at 8 months of age was observed that is not accompanied by cognitive impairment in the Morris water maze task. These results suggest that initially the loss of glutamatergic terminals does not appear to be decisive for the development of cognitive deficits in AD.
8. $A\beta$ administration in VGLUT1 +/- mice caused an increased microglial and astrocytic reactivity (using Iba1 and GFAP markers respectively) in the hippocampus. These data suggest that VGLUT1 terminals loss may increase the vulnerability to subsequent hippocampal insults.
9. Diet supplementation with lipoic acid reversed the cognitive deficits associated to the experimental model of insulin resistance, decreased the expression of peripheral (HOMA index and insulin levels) and increased central insulin resistance markers (pIR, pAKT, pERK), reversed increased levels of ketone bodies (in plasma and hippocampus) and increased expression of VGLUT1. Therefore, it is proposed that lipoic acid may be a potential treatment to reverse the insulin resistance and altered expression of VGLUT1 that could underlie in AD pathogenesis.

10. The results obtained the present study support the idea that in a situation of insulin resistance, metabolism shifts to the production of ketone bodies and acting on VGLUT1 could enhance the glutamatergic deficit in AD. Insulin resistance could be related to the action of A β on the insulin receptor. Although initially this glutamatergic impairment does not seem to be directly related to cognitive decline in AD, the decreased expression of VGLUT1 could facilitate other pathological mechanisms, such as neuroinflammation, and it is this complex combination of factors which could lead to the cognitive deficits associated to AD.

