Universidad de Cádiz

COMPLICACIONES CENTRALES EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y DIABETES MELLITUS: PAPEL DE LA LIRAGLUTIDA



Área de Fisiología

Facultad de Medicina

Universidad de Cádiz

Tesis Doctoral

María José Carranza Naval

COMPLICACIONES CENTRALES EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y DIABETES MELLITUS: PAPEL DE LA LIRAGLUTIDA

María José Carranza Naval

Directora: Mónica García Alloza

Cádiz, mayo 2022

“Hagamos que

el cariño y el amor

sean más fuertes que el olvido”

J.J. Omella

La Dra. Dña. Mónica García Alloza, Catedrática del Área de Fisiología de la Universidad de Cádiz

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado "COMPLICACIONES CENTRALES EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y DIABETES MELLITUS: PAPEL DE LA LIRAGLUTIDA", que presenta la Graduada María José Carranza Naval para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado en el Área de Fisiología perteneciente al Departamento de Biotecnología, Biomedicina y Salud Pública de la Universidad de Cádiz, bajo la dirección de la Dra. García Alloza, y cumple los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, expedimos y firmamos la presente certificación en Cádiz a 27 de mayo de 2022.

GARCIA ALLOZA MONICA - 34768373D

Firmado digitalmente por GARCIA ALLOZA MONICA - 34768373D
Fecha: 2022.05.27 07:59:32 +02'00'

Fdo. Dra. Dña.Mónica García Alloza

DIRECTORA

COMPLICACIONES CENTRALES EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y DIABETES MELLITUS: PAPEL DE LA LIRAGLUTIDA

Disertación presentada por **María José Carranza Naval** para obtener el título de doctor en el Programa de Doctorado en Biomoléculas de la Universidad de Cádiz

Cádiz (España), mayo 2022

Directora: Dra. Mónica García Alloza

Catedrática del Área de Fisiología

Universidad de Cádiz

Departamento de Biotecnología, Biomedicina y Salud Pública.
Área de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz.

FINANCIACIÓN:

1. “Enfermedad de Alzheimer, demencia vascular y diabetes mellitus tipo 2: interrelación y consideraciones terapéuticas”. Entidad financiadora: Programa estatal de I+D+I orientada a los Retos de la Sociedad, Ministerio de Economía y Competitividad, financiado por la Agencia Estatal de Investigación y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Código de investigación: BFU 2016-75038-R. Duración: 2017-2020. Investigador principal: Dra. Mónica García-Alloza.

2. “Diabetes mellitus tipo 2: marcadores de daño central *in vivo* y en tiempo real”. Entidad financiadora: Programa Explora Ciencia. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Código de investigación: BFU2017-91910-EXP. Duración: 2018-2020. Investigador principal: Dra. Mónica García-Alloza.

3. “Enfermedad de Alzheimer, prediabetes y diabetes mellitus tipo 2: modelos preclínicos y consideraciones translacionales” (ALDIAB). Entidad financiadora: Junta de Andalucía-ITI, Cádiz, y cofinanciado por FEDER. Código de investigación: PI0008-2017. Duración: 2017-2022. Investigador principal: Dra. Mónica García-Alloza.

4. “Retinal and cognitive dysfunction in type 2 diabetes: unraveling the common pathways and identification of patients at risk of Dementia (RECOGNISED)”. Entidad financiadora: Comisión Europea dentro del Programa Horizonte 2020. Código de proyecto: 847749. Duración: 2020-2023. Coordinador: Dr. Rafael Simón. Investigador principal local: Dra. Mónica García-Alloza.

5. “Diabetes y Enfermedad de Alzheimer: implicaciones en retina y cerebro” (DELETE). Entidad financiadora: Ayudas I+D+I en Universidades y Centros de Investigación Públicos. PAIDI 2020. Código de investigación: P20-00928. Duración: 2021-2023. Investigador principal: Dra. Mónica García-Alloza.

6. “Complicaciones tempranas en la enfermedad de Alzheimer y en diabetes mellitus tipo 2: implicaciones farmacológicas”. Entidad financiadora: Programa Estatal de Generación de Conocimiento y Fortalecimiento Científico y Tecnológico del Sistema de I+D+i y del Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad, del Plan Estatal de Investigacion Científica y Técnica y de Innovacion. Código de investigación: PID2020-115499RB-I00. Duración: 2021-2024. Investigador principal: Dra. Mónica García-Alloza

ÍNDICE

I. RESUMEN 17

II. ABSTRACT 19

III. LISTA DE ABREVIATURAS 21

IV. INTRODUCCIÓN 23

4.1. Enfermedad de Alzheimer 25

4.1.1 Consideraciones epidemiológicas sobre la enfermedad de Alzheimer 25

4.1.2 Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer 26

4.2. Diabetes mellitus 30

4.2.1 Consideraciones epidemiológicas sobre la diabetes mellitus 30

4.2.2 Fisiopatología de la diabetes mellitus 31

4.3. Relación entre la EA y la DM2 33

4.4. La patología de la EA y la DM2: consideraciones terapéuticas 36

4.4.1 Liraglutida 37

4.5. Modelos animales 41

4.5.1 Modelos animales de EA 41

4.5.2 Modelos animales de DM2 42

4.5.3 Modelos animales mixtos de EA y DM2 43

V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 47

5.1. Hipótesis 49

5.2. Objetivos 50

5.2.1 Objetivo general 1 50

Objetivos específicos 50

5.2.2 Objetivo general 2 50

Objetivos específicos 50

VI. MATERIAL Y MÉTODOS 51

6.1. Animales y tratamientos 53

6.2. Caracterización metabólica 55

6.3. Estudios de comportamiento 55

6.3.1 Laberinto acuático de Morris 55

6.3.2 Actividad motora y test de discriminación de nuevo objeto 56

6.4. Procesamiento de muestras y tejido 58

6.4.1 Histomorfología cerebral: tinción cresil violeta 58

6.4.2 Daño vascular: tinción azul Prusia 59

6.4.3 Patología neuronal 59

6.4.4 Neuroinflamación: inmunotinición Iba-1/4G8 61

6.4.5 Patología amiloide 62

6.4.6 Patología tau: fosforilación de tau 63

6.4.7 Expresión de ARN mensajero del receptor de insulina A (IR-A) y B (IR-B) y del receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R) 64

6.5. Análisis estadístico 65

VII. RESULTADOS 67

7.1. La LRGT mejoró las alteraciones metabólicas en ratones modelo de DM2 y de EA-DM2 69

7.1.1 Los niveles de glucosa posprandiales se redujeron en los ratones diabéticos tratados 69

7.1.2 Los niveles de insulina se mantuvieron con el tratamiento con LRGT 70

7.1.3 El peso corporal de los animales modelo de EA-DM2 se mantuvo con el tratamiento con LRGT 72

7.2. La LRGT mejoró el deterioro cognitivo en ratones APP/PS1xdb/db 73

7.2.1 La LRGT mejoró la memoria espacial en el MWM 73

7.2.2 La LRGT mejoró la memoria episódica en la prueba de discriminación de nuevo objeto en los ratones modelo de EA-DM2 75
7.3. El tratamiento con LRGT no afectó a la actividad motora 76
7.4. La LRGT redujo la atrofia cerebral y la pérdida neuronal 78
7.4.1 La LRGT mantuvo el peso cerebral 78
7.4.2 El tratamiento con LRGT contribuyó a mantener la integridad cortical sin afectar a otras regiones 78
7.4.3 La densidad neuronal se mantuvo tras el tratamiento con LRGT 81
7.5. La curvatura neuronal se redujo después del tratamiento con LRGT 83
7.6. La LRGT redujo la patología amiloide 85
7.6.1 La carga y el tamaño de las placas amiloides disminuyó tras el tratamiento con LRGT en ratones con EA 85
7.6.2 La LRGT no tuvo efecto sobre la densidad vasos penetrantes corticales con CAA 89
7.6.3 El tratamiento con LRGT no afectó a los niveles de βA40 o βA42 pero redujo los niveles de βA oligomérico en la corteza de los ratones modelo de EA-DM2 ... 89
7.7. El tratamiento con LRGT redujo la patología tau 91
7.8. La LRGT redujo las hemorragias corticales espontáneas en ratones modelo de EA-DM2 92
7.9. La LRGT redujo la activación de la microglía en ratones modelo de EA-DM2 95
7.10. La LRGT no tuvo efecto sobre la expresión de ARNm de IR-A, IR-B o IGF-1R ... 98
VIII. DISCUSIÓN 99
8.1. Efecto del tratamiento con LRGT en las alteraciones metabólicas 102
8.2. Efecto de la LRGT en la atrofia cerebral 103
8.3. Papel de la LRGT en la patología neuronal 104
8.4. Efecto de la LRGT en la patología amiloide 106
8.5. Papel de la LRGT en la patología tau 108

8.6. Efecto de la LRGT en el proceso inflamatorio 109
8.7. Papel de la LRGT en la patología vascular 110
8.8. Efecto de la LRGT en la señalización de insulina 112
8.9. Papel de la LRGT en la cognición 113
IX. CONCLUSIONES 115
X. BIBLIOGRAFÍA 119
XI. AGRADECIMIENTOS 145
XII. ANEXOS 153
ANEXO 1. PUBLICACIONES ORIGINALES INCLUIDAS EN EL TRABAJO 155
ANEXO 2. OTRAS PUBLICACIONES ORIGINALES NO INCLUIDAS EN ESTE TRABAJO . 179
ANEXO 3. OTROS TRABAJOS 180
3.1 Comunicaciones orales a Congresos Internacionales 180
3.2 Comunicaciones a Congresos Internacionales (pósters) 180
3.3 Trabajos en revisión para su publicación 181
ANEXO 4. VISTO BUENO DEL ÓRGANO HABILITADO 182

I. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia. Se caracteriza neuropatológicamente por el depósito del péptido β-amiloide (βA), la presencia de ovillos neurofibrilares y una profunda pérdida neuronal y sináptica. Si bien el principal factor de riesgo para padecer EA es la edad, múltiples estudios demuestran que las alteraciones metabólicas, y concretamente la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), tienen un papel relevante. Con el fin de profundizar en los mecanismos que relacionan las alteraciones metabólicas producidas por la DM2 y la EA, nuestro laboratorio ha desarrollado un modelo murino mixto de EA y DM2 (el ratón APP/PS1xdb/db). Este modelo animal permite valorar el papel de las alteraciones metabólicas en el sistema nervioso central y específicamente en la EA.

Por otro lado, en la actualidad, la EA no tiene un tratamiento exitoso y por ello es necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas que puedan prevenir, retrasar o tratar esta patología. Aunque con limitaciones, la DM2 cuenta con diversos tratamientos. Teniendo en cuenta la relación entre ambas patologías y la necesidad de un tratamiento eficaz para la EA, resultan interesantes estudios sobre fármacos antidiabéticos que limiten o ralenticen las complicaciones cerebrales de la EA. Entre estos se incluyen agonistas del péptido similar al glucagón, como la liraglutida (LRGT). Estudios previos han mostrado que la LRGT puede mejorar las alteraciones del sistema nervioso central en modelos animales de EA, aunque no conocemos estudios en los que se valore su papel en la patología cerebral cuando la EA y la DM2 coexisten. Además, en la actualidad se está probando la LRGT en pacientes con EA en el ensayo clínico Evaluating Liraglutide in Alzheimer's Disease (ELAD).

En este trabajo hemos compendiado los estudios que analizan el papel de la LRGT en la EA, centrándonos en modelos animales de la enfermedad y su función a nivel cognitivo y en la patología tipo Alzheimer. Estos artículos han sido analizados y recopilados en un artículo de revisión. Además, hemos estudiado el efecto tratamiento con LRGT a largo plazo (administrado entre las 6 y 26 semanas de edad) en las alteraciones cognitivas, daño central y alteraciones metabólicas en modelos murinos de EA, DM2 y en el modelo mixto de EA y DM2.

I. RESUMEN

El tratamiento con LRGT redujo los niveles de glucosa en ratones diabéticos (db/db y APP/PS1xdb/db). La LRGT también ayudó a mantener los niveles de insulina en el rango normal. Si bien no se detectó ningún efecto sobre los niveles de ARNm del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1, la LRGT redujo significativamente la atrofia cerebral en los ratones db/db y APP/PS1xdb/db. El tratamiento con LRGT también mejoró la densidad neuronal en los ratones APP/PS1xdb/db en la proximidad y lejos de las placas amiloides. La LRGT redujo la carga de placas amiloides en los animales APP/PS1 así como los niveles de βA oligomérico y la hiperfosforilación de tau en los ratones APP/PS1xdb/db. Las hemorragias espontáneas también mejoraron en los animales APP/PS1xdb/db, y la carga de microglía se redujo en la proximidad de las placas amiloides en los ratones APP/PS1 y APP/PS1xdb/db y en áreas alejadas de las placas amiloides en los ratones db/db y APP/PS1xdb/db. Esta mejora general ayudó a limitar el deterioro cognitivo en ratones modelo de EA y DM2 en la prueba de discriminación de nuevo objeto y en el laberinto acuático de Morris. En conjunto, nuestros datos respaldan el papel de LRGT en la reducción de las complicaciones cerebrales asociadas cuando la DM2 y la EA ocurren simultáneamente, como se observa regularmente en el ámbito clínico.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, diabetes mellitus tipo 2, liraglutida, amiloide, tau, microglía.

II. ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia. At neuropathological level AD is characterized by amyloid-β (Aβ) peptide deposition, the presence of neurofibrillary tangles, and profound neuronal and synaptic loss. Although the main risk factor to suffer AD is age, multiple studies show that metabolic alterations, specifically type 2 diabetes (T2D), may also play a relevant role. In order to deepen into the mechanisms that relate T2D and AD, our laboratory has developed a mixed murine model of AD and T2D (APP/PS1xdb/db mouse). This animal model allows the study of the effects of metabolic alterations in the central nervous system and in AD particularly.

It is also important to bear in mind that at present AD does not have a successful treatment and therefore patients are in a tremendous need of new therapeutic alternatives that can prevent, delay or treat this pathology. Although with evident limitations, T2D patients have different therapeutic options. Given the feasible relation between both pathologies and the fact that AD has no successful treatment, antidiabetic drugs may provide a relevant venue to limit or slow down brain complications in AD. Antidiabetic drugs include glucagon-like peptide agonists, such as liraglutide (LRGT). Previous studies have shown that LRGT can improve central nervous system alterations in animal models of AD, although we are not aware of studies evaluating its role in brain pathology when AD and T2D coexist. In addition, LRGT is currently being tested in AD patients in the Evaluating Liraglutide in Alzheimer's Disease (ELAD) clinical trial.

In this work we have summarized the studies that analyze the role of LRGT in AD with special interest on animal models of the disease and the role of LRGT at cognitive level and in AD pathology. These studies have been analyzed and gathered in a review article. In addition, we have studied the effect of the long-term treatment with LRGT (administered between 6 and 26 weeks of age) on cognitive impairment, brain damage and metabolic alterations in murine models of AD, T2D and in the mixed model of AD and T2D.

LRGT treatment reduced hyperglicaemia in diabetic mice (db/db and APP/PS1xdb/db). LRGT also helped maintain plasma insulin levels. Nevertheless, we did not detect significant differences among groups when we analyzed cortical insulin-like growth

factor receptor 1 mRNA levels. Long-term treatment reduced amyloid plaque burden in APP/PS1 animals as well as oligomeric Aβ levels and tau hyperphosphorylation in APP/PS1xdb/db mice. Also, LRGT significantly reduced brain atrophy in diabetic mice, accompanied by the maintenance of the neuronal population in APP/PS1xdb/db mice in the proximity and far from amyloid plaques. The presence of spontaneous hemorrhages was also limited in APP/PS1xdb/db mice, and microglia burden was reduced in APP/PS1, db/db and APP/PS1xdb/db mice. The overall improvement observed in the brains from APP/PS1xdb/db mice resulted in better performances in the new object discrimination test and the Morris water maze. Altogether, our data support the beneficial effects of LRGT in brain complications when T2D and AD occur simultaneously, as regularly observed in the clinical area.

Keywords: Alzheimer's disease, type 2 diabetes, liraglutide, amyloid, tau, microglia.

III. LISTA DE ABREVIATURAS

AICD: dominio intracelular de APP

Akt: proteína quinasa B

APP: proteína precursora de amiloide

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

βA: β-amiloide

BACE1: β-secretasa

BSA: albúmina de suero bovino

CAA: angiopatía amiloide cerebral

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DM: diabetes mellitus

DM1: diabetes mellitus tipo 1

DM2: diabetes mellitus tipo 2

DRG: dieta rica en grasa

EA: enfermedad de Alzheimer

ELAD: Evaluating Liraglutide in Alzheimer´s Disease

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1

GSK3: glucógeno sintasa quinasa 3

Iba-1: molécula ionizada adaptadora de unión a calcio 1

IGF-2: factor de crecimiento insulínico tipo 2

IGF-1R: receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1

IL-10: interleuquina 10

IL-12: interleuquina 12

IL-1β: interleuquina 1 beta

IL-6: interleuquina 6

IR-A: receptor de insulina A

IR-B: receptor de insulina B

III. LISTA DE ABREVIATURAS

IRS-1: sustrato del receptor de insulina 1

IRS-2: sustrato del receptor de insulina 2

LRGT: liraglutida

MWM: laberinto acuático de Morris

NOD: reconocimiento de nuevo objeto

PBS: tampón fosfato salino

PI3K: fosfoinosítido3-quinasa

PS1: presenilina 1

PS2: presenilina 2

ROI: región de interés

SNC: sistema nervioso central

STZ: estreptozotocina

TNFα: factor de necrosis tumoral α

TREM2: receptor de activación expresado en células mieloides 2

TS: tioflavina-S

IV. INTRODUCCIÓN

4.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

4.1.1 Consideraciones epidemiológicas sobre la enfermedad de Alzheimer

El aumento de la esperanza de vida está contribuyendo al incremento de patologías asociadas al envejecimiento. Entre ellas, las demencias son una de las principales causas de dependencia y discapacidad (Garre-Olmo 2018, Lopez y Kuller 2019, OMS 2021). La demencia es un síndrome que afecta a la memoria, al intelecto, al comportamiento, a las capacidades cognitivas e interfiere en la realización de actividades de la vida diaria (OMS 2020). Además, se considera una de las patologías más costosas del siglo XXI. El costo mundial de la demencia en el año 2019 se estimó en 1.3 billones de dólares y estas cifras aumentarán para 2030 hasta alcanzar los 1.7 billones de dólares (Alzheimer´s_Association 2021, OMS 2021).

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más común; supone el 60-70% de los casos y es una de las enfermedades más letales del siglo XXI (Alzheimer_Europe 2020, Garre-Olmo 2018). Actualmente, la EA afecta a 55 millones de personas a nivel mundial. Se estima que en 2030 habrá unos 78 millones de personas con demencia en todo el mundo y unos 139 millones en 2050 (Alzheimer's_Disease_International 2018, Nichols y Vos 2021, OMS 2021).

Aunque la edad es el principal factor de riesgo para sufrir Alzheimer, diversos estudios muestran que tiene una patogenia multifactorial (Crous-Bou y col. 2017, Ikram y col. 2020). Entre el 5-7% de los casos son de origen familiar (Zhu y col. 2015), causados por mutaciones dominantes en diferentes puntos de la producción de β-amiloide (βA), incluyendo la proteína precursora de amiloide (APP), la presenilina 1 (PS1) (la más relevante) y la presinilina 2 (PS2) (Strobel 2021). Sin embargo, la mayoría de los casos de Alzheimer son esporádicos (80-95%) (Zhang y col. 2020). En estas ocasiones, la edad es el principal factor de riesgo. Entre los factores de riesgo genético, el principal es la presencia del alelo APOE4 ya que promueve la agregación de βA en oligómeros y fibrillas (Liu y col. 2017) y reduce su eliminación del líquido intersticial (Castellano y col. 2011), lo que podría conducir al depósito de βA en forma de placas amiloides de núcleo denso (positivo para tioflavina-S (TS)) y angiopatía amiloide cerebral (CAA) (Serrano-Pozo y col. 2021), mientras que el alelo APOE2 es protector frente a la enfermedad (Reiman y col.

2020, Serrano-Pozo y col. 2021). Más recientemente también se ha descrito la importancia del receptor de activación expresado en células mieloides 2 (TREM2) (Carmona y col. 2018), que aumenta la posibilidad de padecer EA por asociarse a procesos inflamatorios (Zhou y col. 2019). TREM2 puede regular la respuesta inflamatoria en células mieloides (Ulrich y col. 2017), correlacionándose la expresión de TREM2 con el depósito amiloide en los pacientes de Alzheimer, además de aumentar su expresión alrededor de las placas amiloides en modelos animales de EA (Wang y col. 2016).

Por otro lado, diferentes estudios han mostrado que ciertos desórdenes metabólicos como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) también pueden ser un factor de riesgo para padecer demencia (Bello-Chavolla y col. 2019, Ikram y col. 2020, Kang y col. 2017, Kshirsagar y col. 2021). Teniendo en cuenta esto y que la DM2 está relacionada con la edad, parece tener un papel importante en el desarrollo de la EA como muestran diversos estudios (Chatterjee y Mudher 2018, Pal y col. 2018, Peters y col. 2017).

4.1.2 Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer

Las características neuropatológicas de la EA incluyen: **I)** acumulación del péptido βA, derivado de la APP por acción de las β- y γ-secretasas, pudiéndose depositar extracelularmente formando placas amiloides y CAA entorno a los vasos leptmeníngeos, **II)** formación de ovillos neurofibrilares, por el depósito intraneuronal de proteína tau anormalmente fosforilada y **III)** la pérdida neuronal y sináptica, rasgo patológico que mejor se correlaciona con la duración y gravedad de la enfermedad (Calderon-Garcidueñas y Duyckaerts 2017, Reitz y Mayeux 2014, Serrano-Pozo y col. 2011).

4.1.2.1 Patología amiloide

El βA es un péptido de entre 39 y 43 aminoácidos derivado del procesamiento de la APP. Ésta es una proteína de membrana tipo I de gran tamaño (695-770 aminoácidos) que sigue la ruta exocítica en su formación o se puede introducir en las células a través de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (Panza y col. 2019, Serrano-Pozo y col. 2011).

Se han descrito dos procesos de proteólisis del APP, uno amiloidogénico y otro no amiloidogénico (Baranello y col. 2015, Hampel y col. 2021). El catabolismo de APP por la

vía no amiloidogénica se produce por las proteasas de la familia ADAM (desintegrina y metaloproteinasa) dando lugar a un fragmento APPα soluble, liberado extracelularmente (sAPPα) y un fragmento carboxi-terminal de 83 aminoácidos (C83 o CTFα) anclado a la membrana (Baranello y col. 2015, Folch y col. 2018). ADAM10 es la α-secretasa más activa y compite con la β-secretasa (BACE1) por el procesamiento de la APP. La acción de la α-secretasa impide la acción de la β-secretasa, y por tanto la generación de βA (Folch y col. 2018, Hampel y col. 2021) **(Figura 1 – izquierda).**

La vía amiloidogénica implica primero la escisión de APP por la acción de BACE1 que genera el extremo transmembrana C-terminal de 99 aminoácidos (C99) y el fragmento N-terminal soluble (sAPPβ), que posteriormente es escindido por la γ-secretasa, compuesta por PS1, PS2, nicastrina, APH-1 y PEN-2 (potenciador de PS2), liberando βA al espacio extracelular. El dominio intracelular de APP (AICD), procedente de la escisión inicial de BACE1, se libera en el espacio intracelular (Baranello y col. 2015, Duggan y McCarthy 2016, Folch y col. 2018) **(Figura 1-derecha)**.

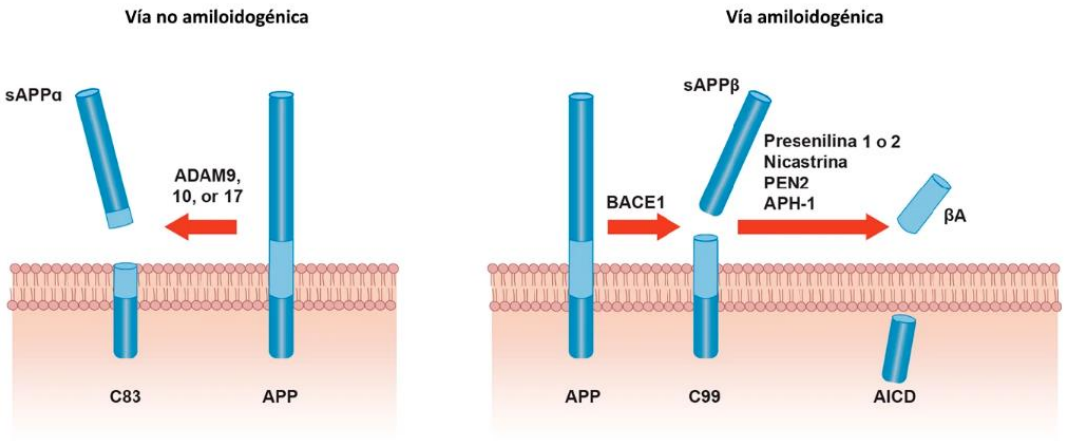


FIGURA 1 || Procesamiento de la APP por las vías no amiloidogénica y amiloidogénica. Imagen modificada de (Hampel y col. 2021). Fragmento APPα soluble (sAPPα), fragmento carboxi-terminal de 83 aminoácidos (C83), maduración funcional de la desintegrina A y la metaloproteinasa 9, 10, 17 (ADAM 9,10,17), proteína precursora del amiloide (APP), fragmento N-terminal soluble (sAPPβ), extremo transmembrana C-terminal de 99 aminoácidos (C99), dominio de APP (AICD), β-amiloide (βA).

Las especies más abundantes de βA en el espacio extracelular resultantes del catabolismo de APP por las enzimas β- y γ-secretasas en la vía amiloidogénica son el βA40 y el βA42. El βA40 es el constituyente principal de la CAA y el βA42 tiene una mayor tendencia a polimerizar y dar lugar a oligómeros solubles que se agregan formando protofibrillas (solubles) y agregados en las placas amiloides (Katzmarski y col. 2020, Lee

y col. 2017). Las mutaciones de APP o de las enzimas proteolíticas (PS1 y PS2) que generan βA son responsables de la mayoría de los casos conocidos de EA familiar (Folch y col. 2018, Sun y Roy 2018).

El desequilibrio entre la formación, degradación y eliminación de βA desempeña un papel clave en la patogénesis de EA, conduciendo a su depósito y provocando disfunción sináptica, hiperfosforilación de la proteína tau y agregación de ovillos neurofibrilares, dando lugar a la muerte neuronal (Baranello y col. 2015). El depósito de βA en la túnica media de los vasos leptomeníngeos, incluyendo arterias y capilares corticales, arteriolas pequeñas y arterias medianas, particularmente en las regiones posteriores del cerebro, da lugar a la CAA (Hamaguchi y col. 2021). Ésta puede debilitar la pared de los vasos y causar hemorragias lobulares potencialmente mortales (Medina y Avila 2013, Moreth y col. 2013). Aunque puede observarse CAA aislada en algunos pacientes, de modo general un 80% de los enfermos de Alzheimer también presentan depósito de βA en torno a los vasos (Greenberg 2013).

4.1.2.2 Patología tau

Tau pertenece a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos (Bhat y col. 2004, Weingarten y col. 1975). La proteína tau es el principal componente de los ovillos neurofibrilares. Son agregados intraneuronales de proteína tau hiperfosforilada y mal plegada que quedan depositados en el parénquima cuando mueren estas neuronas (Arnsten y col. 2021, Canepa y Fossati 2020, Dubois y col. 2010, Serrano-Pozo y col. 2011). El número de ovillos neurofibrilares en el cerebro de los pacientes de Alzheimer está estrechamente ligado a la gravedad de la demencia (Nelson y col. 2012, Serrano-Pozo y col. 2011). En este sentido, se ha descrito que los ovillos neurofibrilares además son responsables de alteraciones en la plasticidad sináptica del hipocampo (Batool y col. 2016, Tong y col. 2015) y en el transporte axonal, así como de la generación de axones distróficos, la pérdida sináptica y la muerte neuronal (Iqbal y Grundke-Iqbal 2008). Estudios en modelos animales también muestran que el depósito de ovillos neurofibrilares tiene un efecto deletéreo en los procesos de aprendizaje y memoria (Kreilaus y col. 2021).

La fosforilación de tau está mediada por múltiples proteínas quinasas, como la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) que es responsable de la mayoría de fosforilaciones anormales en los ovillos neurofibrilares (Nizynski y col. 2017, Sayas y Ávila 2021). La GSK3 tiene dos isoformas muy similares en los mamíferos, GSK3α y GSK3β (Frame y Cohen 2001, Sayas y Ávila 2021), que actúan sobre diferentes sustratos (Soutar y col. 2010). GSK3 se considera un vínculo entre la patología βA y tau (Hernández y col. 2010, Sayas y Ávila 2021), ya que la desregulación de esta proteína quinasa, especialmente su isofoma GSK3β, afecta al metabolismo y toxicidad de βA y de tau (Lauretti y col. 2020). Por tanto, la sobreexpresión de GSK3β en modelos de ratón puede explicar, al menos en parte, el deterioro cognitivo, la hiperfosforilación de tau, el aumento de la producción de βA, la muerte neuronal y la neuroinflamación en la EA (Gómez de Barreda y col. 2010, Kandar y col. 2021, Lauretti y col. 2020, Liu y col. 2020, Llorens-Martín y col. 2014).

4.1.2.3 Neurodegeneración y neuroinflamación

El proceso neurodegenerativo supone el daño de las sinapsis, la degeneración de los axones y la atrofia de las dendritas (Serrano-Pozo y col. 2011). La pérdida neuronal es la característica histológica que mejor se asocia con la gravedad y duración de la demencia (Puzzo y col. 2015). También es la principal causa de la atrofia cortical observada en la EA. La distribución de la pérdida neuronal se correlaciona con la ubicación de los ovillos neurofibrilares, aunque la presencia de ovillos no es suficiente para explicar la enorme pérdida neuronal observada en pacientes con Alzheimer (Serrano-Pozo y col. 2011, Wegmann y col. 2015). La hiperfosforilación de tau, las placas amiloides, el estrés oxidativo y la neuroinflamación contribuyen al proceso neurodegenerativo (Forner y col. 2017, Heneka y col. 2015, Tracy y Gan 2018).

La inflamación en el organismo está destinada a ser protectora, pero una respuesta inflamatoria excesiva puede causar o contribuir al daño tisular y a la patología de la EA (Hashioka y col. 2021). En los cerebros con Alzheimer se producen cambios neuroinflamatorios que incluyen alteraciones en la morfología y distribución de astrocitos y microglía, aumentando la expresión de mediadores inflamatorios (Onyango y col. 2021, Preman y col. 2021). Las células microgliales son los macrófagos del sistema nervioso central (SNC) y tienen un papel importante como primera línea de defensa inmunológica en las lesiones cerebrales. Poseen la capacidad de fagocitar los productos

tóxicos, liberar factores citotóxicos y pueden funcionar como células presentadoras de antígenos (Liang y col. 2021, Zhao y col. 2021). Sin embargo, aunque la respuesta de la microglía a la lesión es beneficiosa por lo general, en casos de lesión crónica e inflamación, como ocurre en la EA, puede dejar de serlo y disminuir su capacidad de eliminación de βA, contribuyendo a la progresión de la EA (Zhao y col. 2021).

4.2. DIABETES MELLITUS

4.2.1 Consideraciones epidemiológicas sobre la diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una de las patologías más prevalentes en el mundo. En la actualidad 536.6 millones de adultos (entre 20-79 años) padecen DM y se estima que para 2045, 783.2 millones de personas de entre 20-79 años padecerán DM (International_Diabetes_Federation 2019, Khan y col. 2020, Saeedi y col. 2019). La mortalidad relacionada con la diabetes es también alarmante, ya que según datos de 2019, 4.2 millones de adultos murieron por esta patología, lo que equivale a una muerte cada 8 segundos (Saeedi y col. 2019). La carga económica asociada la diabetes también continuará aumentando y se estima que para 2030 supere los 825 mil millones de dólares anuales sólo en EEUU (Bommer y col. 2018, International_Diabetes_Federation 2019).

La diabetes tipo 1 (DM1) es la más prevalente en niños menores de 15 años, pero pueden padecerla personas de cualquier edad. Actualmente, más de 500.000 niños a nivel mundial son diabéticos tipo 1. La incidencia de la DM1 está aumentando en todo el mundo y se estima que cerca de 90.000 niños son diagnosticados cada año (Desai y Deshmukh 2020, Patterson y col. 2019). El riesgo de desarrollar DM1 está asociado con factores tanto genéticos como ambientales (Diaz-Valencia y col. 2015, Green y col. 2021).

Por otro lado, la DM2 suelen padecerla personas mayores, con sobrepeso y obesidad, estilo de vida sedentario y consumo de dietas poco saludables con alto contenido en carne roja y procesada, granos refinados y bebidas azucaradas (Kolb y Martin 2017), aunque actualmente se están notificando casos de DM2 en niños y jóvenes (Lascar y col. 2018). Los diabéticos tipo 2 son la principal población diabética, ya que suponen

aproximadamente el 90% del total de pacientes (Chatterjee y col. 2017, Zheng y col. 2018).

La Federación Internacional de Diabetes (IDF) resalta la necesidad de llevar a cabo más estudios de incidencia que indiquen cómo cambia a lo largo del tiempo en una población el riesgo de desarrollar diabetes (International_Diabetes_Federation 2019). En España se realizó un estudio en 2020, donde se estimó que la incidencia de diabetes en nuestro país es de 11,6 casos/1.000 personas-año, lo que supone que cada año se diagnostican alrededor de 386.000 nuevos casos de diabetes en la población adulta (Rojo-Martínez y col. 2020).

4.2.2 Fisiopatología de la diabetes mellitus

La DM es un trastorno metabólico crónico que se caracteriza por un aumento persistente de los niveles de glucosa en sangre durante un periodo de tiempo y un metabolismo alterado de lípidos, carbohidratos y proteínas, causado por insuficiencia completa o parcial de la secreción o de la acción de la insulina (American_Diabetes_Association 2020, Craft 2009). La insulina interviene en la eliminación de la glucosa en sangre, activando el transporte de la glucosa al citosol. Por tanto, la falta de insulina y/o la alteración de los receptores insulínicos determinan significativamente el metabolismo de la glucosa (Posner 2017). La hiperglucemia persistente está asociada con síntomas como poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y en ocasiones complicaciones como la cetoacidosis diabética y el coma hiperosmolar (Kalscheuer y col. 2017).

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes, las formas más comunes incluyen la diabetes mellitus insulinodependiente o DM1, y la diabetes mellitus no insulinodependiente o DM2, precedida en la mayoría de los casos por una prediabetes, la diabetes gestacional y tipos de diabetes debidos a otras causas (síndromes de diabetes monogénica, enfermedades exocrinas del páncreas -fibrosis quística y pancreatitis-, diabetes inducida por medicamentos -glucocorticoides-) (American_Diabetes_Association 2020, Hierro-Bujalance y Garcia-Alloza 2020).

La clasificación de la DM es relevante para un mejor enfoque terapéutico, aunque hay veces que los pacientes no pueden clasificarse estrictamente como diabéticos tipo 1 ó 2

(American_Diabetes_Association 2020). La DM1 y DM2 son enfermedades heterogéneas en las que su clínica y progresión pueden variar según el paciente y no están inequívocamente relacionadas con la edad como se pensaba hasta hace unos años. Sin embargo, es cierto que la prevalencia de DM2 se incrementa con la edad y el progresivo envejecimiento de la población indica que esta patología va en aumento (Goodall y col. 2021, Hierro-Bujalance y Garcia-Alloza 2020).

4.2.2.1 Diabetes mellitus tipo 1

La DM1 es una patología crónica caracterizada por la destrucción de las células β-pancreáticas, que provoca una deficiencia de insulina y una hiperglucemia. Esta forma de diabetes es causada en la mayoría de los casos por un proceso autoinmune y concomitantemente con la formación de autoanticuerpos que se asocian a la DM1 (Sørgjerd 2019). Estos autoanticuerpos aparecen muchos meses o años antes del inicio de los síntomas. Aunque no se considera que los autoanticuerpos sean patogénicos, sirven como biomarcadores del desarrollo de la autoinmunidad (Sørgjerd 2019). Por tanto, la predisposición genética determinada principalmente por los genes de clase II, como el antígeno leucocitario humano, y los factores ambientales juegan un papel importante en el proceso de la enfermedad que conduce a la autoinmunidad y finalmente a la DM1 (Pöllänen y col. 2020).

4.2.2.2 Prediabetes y diabetes mellitus tipo 2

La DM2 cursa con una fase inicial, o prediabetes, caracterizada por la resistencia tisular a la insulina debida a una disminución de la capacidad de las células para captar o responder adecuadamente a la insulina, lo que predispone a la hiperglucemia (Echouffo-Tcheugui y Selvin 2021). En esta situación las células β-pancreáticas aumentan la síntesis y secreción de esta hormona, provocando una hiperinsulinemia compensatoria con el fin de mantener la homeostasis metabólica en las primeras etapas de la diabetes, e incluso durante los primeros 8-10 años (Chatterjee y col. 2017, Pal y col. 2018). A medida que avanza la enfermedad, el equilibrio metabólico se rompe y es cuando las células β-pancreáticas se agotan y mueren (Lawlor y col. 2017), la producción de insulina es deficiente y se establece la hiperglucemia y la DM2 (American_Diabetes_Association 2020, Borse y col. 2021).

La DM2 es una causa significativa de morbimortalidad, siendo la novena causa más importante de muerte en 2019 (1,5 millones de defunciones fueron consecuencia directa de este tipo de diabetes) (Chatterjee y col. 2017, Goodall y col. 2021). Los factores de riesgo para padecer DM2 incluyen antecedentes familiares de diabetes, diabetes gestacional, alteración del metabolismo de la glucosa, mala alimentación o inactividad física (American_Diabetes_Association 2020, Chatterjee y col. 2017, Wu y col. 2014). Además, los factores de riesgo cardiometabólicos tradicionales, como hipertensión, dislipidemia y obesidad, comunes en la DM2, aumentan sinérgicamente el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (Ahmed y Goldstein 2006a, Ahmed y Goldstein 2006b, Martin-Timon y col. 2014, Yun y Ko 2021). Asimismo, diversos estudios han asociado la prediabetes y la DM2 con complicaciones del SNC y mayor riesgo de demencia (Chatterjee y Mudher 2018, Karvani y col. 2019, Pal y col. 2018). Es por ello, que la OMS recomienda la actividad física y la nutrición saludable de los niños para prevenir la diabetes y que esto se haga extensivo a los adolescentes y adultos (Bull y col. 2020).

4.3. Relación entre la EA y la DM2

La asociación inicial entre la DM2 y la demencia se remonta al estudio de Rotterdam en el que se observó que los pacientes con DM2 tenían un riesgo relativo aumentado de 1,4 de padecer EA (Ott y col. 1996, Ott y col. 1999). Diversos estudios posteriores han respaldado estos datos (Biessels y Despa 2018, Luchsinger y col. 2004, Sun y col. 2020, Tumminia y col. 2018). Además, la combinación de factores de riesgo cardiovasculares y metabólicos como hipertensión, hipercolesterolemia o la propia DM aumentan el riesgo de padecer EA (Luchsinger y col. 2004). Del mismo modo, la resistencia a la insulina y los niveles de esta hormona son parámetros que se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar EA (Arnold y col. 2018, Schrijvers y col. 2010). En los últimos años, muchos estudios se han centrado en la relación entre la prediabetes, la DM2 y las alteraciones del SNC, haciendo especial hincapié en la neurodegeneración y la demencia, aunque los mecanismos implicados no han sido totalmente esclarecidos (Chatterjee y Mudher 2018).

La hiperglucemia crónica disminuye la elasticidad de las células del músculo liso, reduciendo la capacidad de los vasos sanguíneos para mantener el suministro suficiente

de sangre y nutrientes al tejido cerebral (Bello-Chavolla y col. 2019). Como consecuencia de esto, los pacientes con DM2 presentan infartos subcorticales (Pruzin y col. 2017), estrechamente relacionados con la arteriosclerosis (Ighodaro y col. 2017). Las personas con DM2 muestran una pérdida funcional de la conectividad entre el hipocampo y otras regiones cerebrales (Karvani y col. 2019). Los estudios de pacientes que sufren DM2 revelan una reducción de la sustancia blanca total y de la sustancia gris cortical, subcortical e hipocampal (Bernardes y col. 2018, Ogama y col. 2018). Esto apoya la idea de que la hiperglucemia de larga duración afecta a las estructuras cerebrales y acelera la atrofia cerebral (Karvani y col. 2019).

Además de los estudios que muestran el efecto de la DM2 en el SNC, algunos trabajos se han centrado en analizar la posible relación entre la patología tipo Alzheimer y las alteraciones metabólicas:

Insulina y patología amiloide: la insulina tiene un papel relevante en el metabolismo del βA (Eckman y Eckman 2005, Farris y col. 2003, Fewlass y col. 2004, Phiel y col. 2003). La resistencia insulínica altera la función de BACE1 y γ-secretasa, y acelera la producción y acumulación de βA (Johnson y col. 2017, Kshirsagar y col. 2021, Wei y col. 2021). Por otro lado, la amilina es un polipéptido amiloide sintetizado y secretado junto con la insulina por las células β-pancreáticas. Ésta se acumula con el tiempo y contribuye a la toxicidad en las células β-pancreáticas, dando lugar a una menor secreción de insulina que induce el inicio de la diabetes (Bharadwaj y col. 2017). La amilina constituye el principal componente de los depósitos de amiloide de los islotes pancreáticos que suelen aparecer en los pacientes diabéticos tipo 2 (Ly y Despa 2019). Además, este polipéptido amiloide se acumula en el cerebro de los pacientes con EA y puede interactuar con el βA para exacerbar el proceso neurodegenerativo (Bharadwaj y col. 2017). Asimismo, la neprisilina y la enzima degradadora de insulina están involucradas en la degradación de βA (Baranello y col. 2015, Nalivaeva y col. 2014). Dado que tanto la insulina como el βA son sustratos de la enzima degradadora de la insulina y la neprisilina, niveles altos de insulina, como se observan en el proceso prediabético o en la DM2, pueden comprometer la degradación de βA (Chin-Chan y col. 2018, Esser y Zraika 2019). Además, los oligómeros de βA interfieren en la señalización de insulina porque inhiben la autofosforilación del receptor, reducen su número y actividad en la

superficie de las dendritas del hipocampo, y contribuyen a la sinaptotoxicidad y la neurodegeneración de la EA (Esser y Zraika 2019, Heras-Sandoval y col. 2012).

Insulina y patología tau: estudios previos han mostrado que modificaciones en el metabolismo y en la regulación de la insulina afectan al normal procesamiento de la proteína tau (El Khoury y col. 2014, Mittal y Katare 2016, Park 2001). La GSK3β tiene un papel importante en la fosforilación de tau y está involucrada en la vía de señalización de insulina/fosfatidilinositol3-quinasa/proteína quinasa B (insulina/PI3K/Akt) que regula el metabolismo de la glucosa en el cerebro. La disfunción de esta vía puede conducir a la hiperfosforilación de tau en el cerebro de pacientes con EA (Gabbouj y col. 2019, Hobday y Parmar 2021, Zhang y col. 2018). La insulina regula la expresión de tau, por lo que una disminución en la señalización de insulina altera la expresión del gen Tau (Arnold y col. 2018, Schubert y col. 2004), disminuyendo los niveles de tau soluble y aumentando el acúmulo de tau fosforilada, lo que exacerba la retracción de neuritas, el colapso del citoesqueleto neuronal y las deficiencias en la formación de sinapsis (Tumminia y col. 2018).

Insulina y neurodegeneración: la señalización de insulina en el cerebro es esencial para la plasticidad sináptica, la neuroprotección, la supervivencia, el crecimiento neuronal y el metabolismo energético. Sin embargo, los efectos positivos de la insulina sobre la función cerebral disminuyen cuando la insulina no ejerce su función correctamente, como ocurre cuando se produce la resistencia a la insulina (Beeri y Bendlin 2020). Estudios previos también han mostrado que la resistencia a la insulina es responsable, al menos en parte, de la neurodegeneración en la EA (Arnold y col. 2018). Aunque los mecanismos aún no se conocen con exactitud, las concentraciones anómalas de insulina periférica de forma crónica también pueden reducir la disponibilidad de la insulina para su transporte al cerebro, lo que conlleva una deficiencia de insulina cerebral (Kellar y Craft 2020, Stoeckel y col. 2016). Además, estudios previos han mostrado el papel de la insulina en la regulación de la función sináptica y neuronal en el hipocampo, corteza y cerebelo (Chiu y col. 2008, Mullins y col. 2017, Zhao y Alkon 2001).

Insulina y neuroinflamación: la resistencia a la insulina cerebral se produce a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias, como TNFα, IL-6, IL-12 o IL-1β, en el cerebro. Estas citoquinas son producidas periféricamente y pueden atravesar la barrera

hematoencefálica contribuyendo al proceso neuroinflamatorio (Akhtar y Sah 2020). Las citoquinas fosforilan el residuo de serina del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) e inhiben a fosforilación de tirosina de IRS-1 regulada por la insulina, alterando la señalización de insulina mediada por IRS-1 y dificultando las acciones de la insulina. Por tanto, se pierden los efectos protectores de la insulina, contribuyendo a la progresión de la EA (Bosco y col. 2011, Calsolaro y Edison 2016).

4.4. LA PATOLOGÍA DE LA EA Y LA DM2: CONSIDERACIONES TERAPÉUTICAS

Actualmente la EA no tiene tratamiento exitoso ni cuenta con alternativas terapéuticas que eviten o retrasen su desarrollo. Así la terapia administrada se centra en el uso del antagonista glutamatérgico, la memantina (Grossberg GT 2013, Reisberg y col. 2003, Zhang y col. 2021) y de inhibidores de la acetilcolinesterasa como el donezepilo, la rivastigmina o la galantamina (Khoury R 2018, Krall y col. 1999, Zhang y col. 2021). Teniendo en cuenta que estos fármacos únicamente proporcionan un alivio sintomático de la enfermedad, se han propuesto tratamientos basados en la hipótesis amiloide, como inhibidores de las β- y γ-secretasas (Eckman y Eckman 2005, Vieira y col. 2017) o inmunoterapia antiamiloide (Athar y col. 2021, Benhamron y col. 2018, Hung y Fu 2017) como el tratamiento con aducanumab, aprobado recientemente por la Administración de Drogas y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos mediante el proceso de aprobación acelerada. Aducanumab es un anticuerpo monoclonal que se une preferentemente a los agregados βA y reduce las placas de amiloide (Salloway y Cummings 2021, Yang y Sun 2021). Es importante considerar que en los últimos 18 años aducanumab es la única terapia aprobada para el tratamiento del Alzheimer y esto supone una nueva vía en la terapia antiamiloide. Sin embargo los beneficios parecen limitados (Knopman y Perlmutter 2021) y su aprobación por la FDA se apoya en marcadores secundarios, como la reducción de las placas de amiloide detectadas mediante tomografía por emisión de positrones (Hershey y Tarawneh 2021). A esto debe sumarse el hecho de que la reducción de los depósitos de amiloide no conlleva necesariamente una mejora cognitiva (Hershey y Tarawneh 2021). Por todo ello, aunque la relevancia de este nuevo fármaco parece indiscutible, sigue siendo necesario investigar otras alternativas terapéuticas para la población que sufre EA.

Los tratamientos disponibles para la DM2 tienen limitaciones evidentes; sin embargo, las posibiliades continúan aumentando. Entre estos fármacos se incluyen terapia con insulina humana y análogos de insulina, metformina, sulfonilureas, tiazolidinedionas, glitazonas, inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (Tan y col. 2019), inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 o agonistas del receptor del péptido similar al glucagón (GLP-1) (Bendlin 2019, Muñoz-Jiménez y col. 2020, Parthsarathy y Holscher 2013). Entre estos últimos, la liraglutida (LRGT) (*Victoza, Novo Nordisk*) es un agonista del receptor del GLP-1 de uso cotidiano entre pacientes con DM2 (During y col. 2003).

4.4.1 Liraglutida

Tal y como hemos revisado recientemente en el artículo de Vargas-Soria, Carranza-Naval y col. (Vargas-Soria y col. 2021) **(Anexo 1)** la LRGT es una incretina que promueve la secreción de insulina a través de receptores en las células β del páncreas (Courreges y col. 2008). Otros estudios sugieren un posible papel neuroprotector de la LRGT en estadios avanzados de la EA (Holscher 2018, Xie y col. 2021, Zheng y col. 2021). En este sentido, trabajos con otros agonistas del receptor del GLP-1, como la lixisenatida, muestran un patrón neuroprotector similar en modelos murinos de EA (Cai y col. 2018, McClean y Holscher 2014).

El GLP-1 está implicado en el control de la glucemia y la homeostasis metabólica, tanto en la periferia como en el SNC (Katsurada y Yada 2016, Timper y col. 2020). Debido a la importancia de la señalización del GLP-1 en la función cognitiva (Grieco y col. 2019) y la relación entre EA y DM2 (Chatterjee y Mudher 2018), los análogos del GLP-1, y la LRGT específicamente, pueden tener un papel beneficioso en la patología propia de la EA (Wiciński y col. 2019). Estudios previos han mostrado algunos resultados controvertidos en modelos de EA. Mientras que el peso del cerebro (Chen y col. 2017a, Duarte y col. 2020), los niveles de insulina en el hipocampo (Batista y col. 2018, Duarte y col. 2020, Qi y col. 2017, Qi y col. 2016), los niveles de glucosa cortical o de los transportadores de glucosa (GLUT1, GLUT4) no parecen verse afectados (Duarte y col. 2020), el tratamiento con LRGT aumenta los receptores del GLP-1 en el hipocampo de ratones modelo de EA (Qi y col. 2017, Qi y col. 2016, Zhang y col. 2019). De forma similar, la LRGT incrementa los niveles del receptor de insulina en un modelo de primates con EA (Batista y col. 2018). Este fármaco mejora la resistencia a la insulina en el hipocampo reduciendo los

niveles de fosforilación del receptor de insulina y del IRS-1 (Long-Smith y col. 2013, Paladugu y col. 2021). Curiosamente, la enzima degradadora de insulina que se reduce en los modelos preclínicos de EA, y es un mecanismo subyacente para la EA y la DM2 (Kulas y col. 2019, Li y col. 2018), se conserva o aumenta en la corteza y el hipocampo de ratones con EA después del tratamiento con LRGT (Li y col. 2018, McClean y Hölscher 2014a, Paladugu y col. 2021). Asimismo, diversos estudios han mostrado la capacidad de la LRGT para disminuir el depósito de amiloide, mejorar la memoria, la transmisión sináptica dañada y la inflamación (Cao y col. 2018b, During y col. 2003, Hansen y col. 2016a, Li y col. 2010, McClean y Holscher 2014, McClean y col. 2015, Watson y col. 2019).

Los estudios de cohortes han revelado un papel limitado de la DM2 en las características neuropatológicas clásicas de la EA (amiloide, placas y ovillos) (Biessels y Despa 2018). Sin embargo, trabajos en animales muestran los beneficios de la LRGT con diferentes protocolos de administración (Chen y col. 2017c, Duarte y col. 2020, Maskery y col. 2020, McClean y col. 2015), incluidos los tratamientos profilácticos (McClean y col. 2015) y a largo plazo (Hansen y col. 2016a, Parthsarathy y Holscher 2013, Zheng y col. 2021). Aunque algunos estudios muestran que la LRGT no tiene efecto en la patología amiloide (Hansen y col. 2016b), la mayoría de los resultados muestran que la LRGT reduce de forma drástica el tamaño de las placas amiloides (Holubová y col. 2019), el número de placas (Holubová y col. 2019, Long-Smith y col. 2013) y la carga de βA (Hansen y col. 2016a, McClean y col. 2011, Salles y col. 2020) **(Figura 2).** Trabajos previos han mostrado que el tratamiento con LRGT tiene un efecto positivo si se administra antes de que comience el depósito de amiloide (McClean y col. 2015). Además, la LRGT limita la hiperfosforilación de tau mediante la modulación de la actividad de las quinasas ERK y JNK en ratones 3xTgAD (Chen y col. 2017a, Duarte y col. 2020), APP/PS1 (Holubová y col. 2019) y hTauP301L (Hansen y col. 2016a). Igualmente, reduce la fosforilación de tau en el hipocampo modulando Akt y GSK3β (Qi y col. 2016). También, la LRGT mejora la plasticidad sináptica (Han y col. 2013, McClean y Hölscher 2014a), la densidad (Batista y col. 2018), la estructura (Qi y col. 2016, Zheng y col. 2021) y el número de sinapsis, aumentando los niveles de sinaptofisina y PSD95 en ratones modelo de EA (McClean y col. 2015, McClean y col. 2011). Además, este fármaco no sólo atenúa la pérdida y

degeneración neuronal, sino que aumenta la neurogénesis en la corteza (McClean y Hölscher 2014b, Parthsarathy y Holscher 2013) y la zona subventricular (Salles y col. 2018, Salles y col. 2020), reduce la cantidad de células dañadas en la corteza y el hipocampo (Chen y col. 2017a) y aumenta la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo de animales modelo de EA (Parthsarathy y Holscher 2013).

La inflamación es una característica importante de la EA y estudios previos muestran que la LRGT reduce la microgliosis y la astrocitosis en la corteza y el hipocampo (Holubová y col. 2019, Salles y col. 2018, Salles y col. 2020). Además, la LRGT limita las citoquinas proinflamatorias, incluyendo TNFα, IL-1β o IL-10 (Duarte y col. 2020, Maskery y col. 2020). De acuerdo con estas observaciones, la LRGT también disminuye el estrés oxidativo cerebral, disminuyendo la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la formación de grupos carbonilo corticales, de nitritos o de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina en ratones 3xTgAD (Duarte y col. 2020). De igual manera, la fosforilación oxidativa de astrocitos corticales se reduce en ratones 5xFAD (Zheng y col. 2021) **(Figura 2)**. Los efectos positivos de la LRGT en la EA apoyan su papel beneficioso en el aprendizaje y la memoria en la mayoría de los estudios. En este sentido, la memoria espacial mejora después del tratamiento con LRGT (Chen y col. 2017c, Maskery y col. 2020, McClean y Hölscher 2014a, Qi y col. 2016, Zhang y col. 2019) y este fármaco también restaura la memoria episódica en diferentes modelos de EA (Batista y col. 2018, McClean y Hölscher 2014a, McClean y col. 2015).

Los resultados descritos anteriormente en modelos preclínicos de EA han sentado las bases para evaluar la LRGT en los pacientes. Mientras que otros fármacos antidiabéticos, incluidos los análogos de GLP-1 o los inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4, han sido parte de ensayos clínicos, los estudios específicos con LRGT todavía son escasos. Un metaanálisis ha demostrado un efecto procognitivo de los fármacos antidiabéticos en la EA/deterioro cognitivo leve aunque, los beneficios reales con LRGT son limitados (Cao y col. 2018a). La administración de LRGT a personas con pérdida subjetiva de memoria, en riesgo de padecer EA, mejora la conectividad entre diferentes regiones cerebrales. Otros trabajos han demostrado que el tratamiento con LRGT a pacientes con EA durante 6 meses aumenta capacidad de transferencia de glucosa sangre-cerebro (Gejl y col. 2017), mejorando las alteraciones cerebrales.

Gejl y col. (Gejl y col. 2016) (ClinicalTrials.gov NCT01469351) también han evidenciado que el tratamiento con LRGT durante 6 meses en pacientes con EA previene la disminución de la tasa del consumo de glucosa, como un indicador de deterioro cognitivo, de la disfunción sináptica y de la evolución de la enfermedad. Sin embargo, la carga de βA o la cognición no parecen verse afectadas. Otra investigación en pacientes con prediabetes tratados con el fármaco ha mostrado recientemente que la LRGT mejora la memoria a corto plazo (Vadini y col. 2020).

Actualmente, el ensayo ELAD (Evaluating Liraglutide in Alzheimer´s Disease) (NCT01843075) tiene como objetivos principales la evaluación en pacientes de Alzheimer de la tasa metabólica de la glucosa cerebral en las regiones corticales y cognitivas, la valoración de los cambios estructurales en resonancia magnética, de la activación microglial y de las alteraciones en patología amiloide y tau (Femminella y col. 2019). Aunque los resultados del ensayo ELAD no se han publicado todavía, parece que la LRGT podría ser una alternativa para retrasar la evolución de la EA (Femminella y col. 2019).

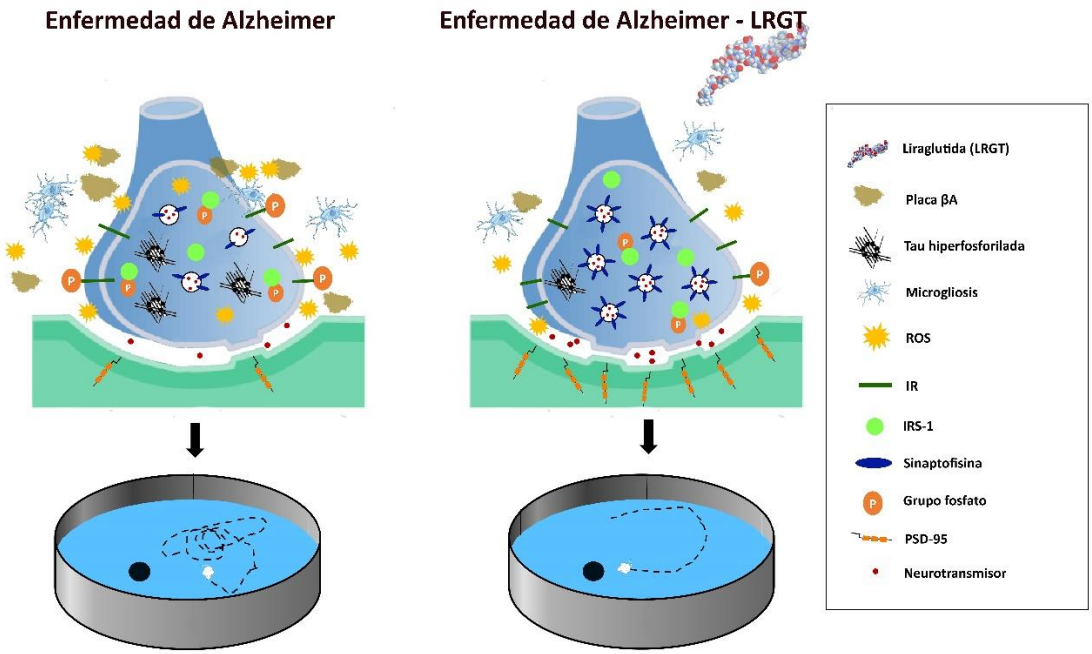


FIGURA 2 || Esquema del funcionamiento de la LRGT en el cerebro de los ratones con EA (Vargas-Soria y col. 2021) mostrando su posible efecto en la patología tau y amiloide, estrés oxidativo, daño sináptico y deterioro cognitivo. Liraglutida (LRGT), placa β-amiloide (placa βA), especies reactivas de oxígeno (ROS), receptor de insulina (IR), sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1), proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95).

4.5. MODELOS ANIMALES

4.5.1 Modelos animales de EA

Aunque la gran mayoría de los casos de EA son esporádicos y las causas subyacentes aún se desconocen, la neuropatología y el fenotipo clínico son generalmente indistinguibles entre la forma familiar de inicio temprano y la forma esporádica de la enfermedad, siendo la principal diferencia la edad de inicio (LaFerla y Green 2012). Por esta razón, los modelos animales se han basado en la utilización de mutaciones genéticas asociadas con la EA familiar, con el fundamento de que los eventos posteriores al desencadenante inicial son bastante similares. Aunque ningún modelo de ratón recapitula el espectro completo de la enfermedad, cada modelo permite un análisis en profundidad de uno o dos componentes de la EA (Dawson y col. 2018, Drummond y Wisniewski 2017, LaFerla y Green 2012).

Una de las proteínas más importantes implicadas en la patogenia de la EA es la APP y se han creado numerosos ratones transgénicos para producir en exceso APP humana de tipo salvaje o mutante, y desarrollar una patología similar a la que se encuentra en el cerebro humano. Las mutaciones humanas de APP inducen la acumulación de Aβ dependiente de la edad en forma de placas amiloides y CAA, igual que ocurre en pacientes (Esquerda-Canals y col. 2017, LaFerla y Green 2012). Entre los modelos clásicos centrados en mutaciones de la APP se encuentra el ratón PDAPP. Este ratón expresa APP humana con la mutación Indiana (APPind) (Drummond y Wisniewski 2017, Games y col. 1995, Rockenstein y col. 1995). Los ratones PDAPP presentan depósito de βA a partir de los 6-9 meses de edad, pero no desarrollan ovillos neurofibrilares ni muestran una pérdida neuronal. En ellos se observa inmunoreactividad para tau fosforilada en neuritas distróficas a partir de los 14 meses de edad (Chen y col. 2000, Masliah y col. 2001). Estos ratones fueron uno de los primeros modelos utilizados para mostrar el aumento del aclaramiento de amiloide cuando los ratones fueron tratados con inmunoterapia (Schenk y col. 1999).

En el modelo APP751, la mutación sueca (APPswe) hace que la APP sea más accesible para BACE1 y da lugar a un aumento en la producción de βA. Los modelos APP23 (Sturchler-Pierrat y col. 1997) y Tg2576 (Hsiao y col. 1996) también expresan la mutación

APPswe. Ambos desarrollan placas de βA a los 6 y a los 10-11 meses de edad respectivamente. El deterioro cognitivo comienza alrededor de los 4 meses de edad en el ratón APP23 y en torno a los 10 meses de edad en el ratón Tg2576. En el mismo sentido, el modelo APP23 muestra pérdida neuronal en la región CA1 del hipocampo a edades tardías, mientras que el ratón Tg2576 no muestra pérdida neuronal. Además de placas amiloides ambos modelos pueden desarrollar CAA y los ratones APP23 también desarrollan microhemorragias con la edad (Drummond y Wisniewski 2017, Winkler y col. 2001).

Otros modelos más complejos incluyen mutaciones tanto en la APP como en la PS1. Los ratones APPswe/PS1dE9 (APP/PS1) se han generado al cruzar animales transgénicos APPswe con ratones con una deleción en el exón 9 de la PS1 (PSEN1dE9) (Jankowsky y col. 2004). Presentan depósito de βA a los 6 meses de edad y CAA en los vasos leptomeníngeos algo más tardía (Garcia-Alloza y col. 2006b). A nivel conductual muestran déficits en todos los dominios cognitivos (Janus y col. 2015). De modo general, presentan una patología amiloide más temprana que los modelos que únicamente presentan mutaciones en la APP.

Otros modelos desarrollados para reproducir la patología propia de la EA son animales triples transgénicos, como el ratón 3xTg-AD que combina las mutaciones APPSwe, PS1M146V y tauP301L (Oddo y col. 2003). Estos animales producen placas amiloides y ovillos neurofibrilares. El depósito de βA es progresivo, con inmunorreactividad intracelular detectada en algunas regiones del cerebro desde los 3-4 meses de edad. Los depósitos extracelulares de βA aparecen a los 6 meses en la corteza frontal y son más extensos a los 12 meses. Los cambios en tau ocurren más tarde y se detecta tau hiperfosforilada en el hipocampo en torno a los 12-15 meses de edad (Billings y col. 2005, Oddo y col. 2003)

4.5.2 Modelos animales de DM2

La DM2 comienza en la mayoría de los casos con obesidad, es por esto que la DM2 se reproduce en modelos de animales obesos, aunque también hay modelos no obesos, con diversos grados de resistencia a la insulina y fallo de las células β-pancreáticas (King 2012).

Los modelos monogénicos de obesidad más utilizados son deficientes en la señalización de la leptina. La leptina induce saciedad y, por tanto, su déficit causa hiperfagia y posteriormente obesidad. Estos modelos incluyen el ratón $Lep^{ob/ob}$ (ob/ob) (Ingalls y col. 1950), que tiene una mutación espontánea en en gen Lep que impide la secreción de leptina bioactiva (Lindström 2007, Wang y col. 2014) y el ratón $Lep^{db/db}$ (db/db), un KO funcional para el receptor de leptina (Chen y col. 1996). Aunque estos ratones tienen el mismo origen genético, la falta de producción de leptina en los ratones ob/ob o la falta de efecto de la leptina en los animales db/db provoca fenotipos casi idénticos (Coleman 1978, Kleinert y col. 2018). Esta divergencia de antecedentes es lo que produce las diferencias fenotípicas de obesidad grave (ob/ob) frente a diabetes grave (db/db) de donde procede su nomenclatura (ob: obeso, db: diabético) (Coleman 1978, Kleinert y col. 2018).

El ratón ob/ob presenta hiperfagia, obesidad, hiperinsulinemia, hiperglucemia y gasto energético reducido. Por eso son un buen modelo para estudiar la diabetes y la obesidad (Fischer y col. 2020, Lindström 2007). El ratón db/db fue descrito por primera vez por Hummel y col. del Laboratorio Jackson (Hummel y col. 1966) y presenta una mutación autosómica recesiva en el receptor de leptina (Chen y col. 1996). Estos animales muestran hiperfagia, obesidad (se observa a las 3-4 semanas de edad) debido al gasto energético reducido, hiperinsulinemia (en torno a las 2 semanas de edad) e hiperglucemia (se desarrolla entre las 4-8 semanas de edad) (Chatzigeorgiou y col. 2009, Pandey y Dvorakova 2020). El ratón db/db desarrolla una patología cerebral extensa que incluye atrofia cerebral, lesión vascular y aumento de la fosforilación de tau, dando lugar a un deterioro cognitivo severo (Ramos-Rodriguez y col. 2013). El modelo db/db es ampliamente conocido y usado por la comunidad científica que estudia la DM2, la dislipidemia diabética o el cribado de agentes antidiabéticos (Pandey y Dvorakova 2020, Wong y col. 2016).

4.5.3 Modelos animales mixtos de EA y DM2

Aunque la mayoría de los estudios que relacionan la EA y la DM2 son epidemiológicos (Luchsinger y col. 2004, Matsuzaki y col. 2010), se han desarrollado modelos murinos que tratan de reproducir la complejidad de ambas patologías, con el fin de estudiar los

mecanismos subyacentes, como las alteraciones metabólicas o el daño cerebral propio de la EA (Hiltunen y col. 2012, Ramos-Rodriguez y col. 2013, Takeda y col. 2010).

Entre los modelos que inducen diabetes con fármacos podemos encontrar animales APP/PS1 tratados con streptozotocina (STZ), con el fin de desarrollar un modelo mixto de EA y DM1 (Ramos-Rodriguez y col. 2013). En estos animales se ha observado deterioro cognitivo, atrofia cerebral, aumento de las hemorragias espontáneas y de la fosforilación de tau, con afectación preferentemente de la corteza. También se ha descrito una disminución de los niveles de βA, un empeoramiento cognitivo y una sobreexpresión de la enzima degradadora de insulina (Li y col. 2018). Resultados similares se han obtenido en ratones Tg2576 tratados con STZ (Plaschke y col. 2010) y 3xTg-AD tratados con STZ (Chen y col. 2014).

También existen modelos mixtos generados por la administración de una dieta rica en grasa (DRG) a ratones modelo para la EA. Al tratar ratones APP/PS1 con DRG se ha observado una disminución en la señalización de insulina hipotalámica (inducida por la fosforilación de GSK3) así como una pérdida en las habilidades de aprendizaje y memoria y acumulación de péptido βA (Ettcheto y col. 2018, Ruiz y col. 2016). De igual modo, tras alimentar con DRG a ratones 3xTg-AD (Julien y col. 2010) o Tg2576 (Ho y col. 2004, Kohjima y col. 2010) se ha observado un incremento de los oligómeros de βA40 y 42 así como del número de placas amiloides. Del mismo modo, estos modelos también presentan problemas de aprendizaje y memoria (Bomba y col. 2019, Sah y col. 2017).

Takeda y col. (Takeda y col. 2010) desarrollaron hace una década un modelo mixto de EA y DM2 resultante del cruce ratones ob/ob con ratones APP23. En estos animales (APP23xob/ob) se observó una disminución de los niveles de insulina en el cerebro y la señalización de la insulina se vio gravemente afectada. Aunque hasta donde sabemos estos animales únicamente se han caracterizado a edades tempranas, mientras que la EA y la DM2 son enfermedades crónicas de larga duración.

Otros estudios, como el de Hiltunen y col. (Hiltunen y col. 2012), no han observado deterioro cognitivo en un modelo mixto resultante del cruce de ratones APP/PS1 con ratones que sobreexpresan el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF-2). En estos animales sólo se ha observado un ligero compromiso cognitivo cuando los

animales se alimentan con DRG (Hiltunen y col. 2012). Tras el cruce de animales Tg2576 con ratones ob/ob, Lubitz y col. han mostrado que el ratón Tg2576xob/ob no es viable a largo plazo y, por lo tanto, no es un modelo útil para analizar los mecanismos que explican la relación crónica entre la EA y la DM2 (Lubitz y col. 2014). Por otro lado, Niedowicz y col. (Niedowicz y col. 2014) han desarrollado un modelo de DM2 y EA, tras el cruce de ratones db/db (Hummel y col. 1966) y el modelo knock-in $APP^{\Delta NL/\Delta NL}$ x $PS1^{P264L/P264L}$. En estos animales se ha detectado una disminución del depósito de βA, presencia de patología cerebrovascular grave y deterioro cognitivo a edades avanzadas. Paralelamente, en nuestro laboratorio hemos generado un modelo mixto de EA y DM2, mediante el cruce de ratones APP/PS1 con animales db/db. Los ratones APP/PS1 presentan patología amiloide en torno a los 4 meses de edad y a los 6 meses desarrollan abundantes placas amiloides (Garcia-Alloza y col. 2006b). El ratón APP/PS1xdb/db muestra una reducción del tamaño cortical, simplificación de la ramificación neuronal y reducción de la densidad dendrítica, alteraciones en las patologías βA y tau, aumento de las hemorragias espontáneas y alteraciones cognitivas severas en adultos. Además, el proceso patológico sinérgico entre ambas patologías empeora con la edad (Infante-Garcia y col. 2016). Es, por tanto, un modelo de ratón que permite el estudio de ambas patologías, así como de nuevas alternativas terapéuticas (Carranza-Naval y col. 2021, Hierro-Bujalance y col. 2020b, Infante-Garcia y col. 2017b, Infante-Garcia y col. 2018).

V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1. HIPÓTESIS

El tratamiento con el fármaco antidiabético LRGT podría retrasar o reducir la patología metabólica y del SNC en un modelo murino mixto de EA y DM2.

Justificación:

Desde el estudio de Rotterdam se sabe que los pacientes con DM2 presentan un riesgo relativo aumentado de padecer EA (Ott y col. 1996, Ott y col. 1999). Estudios epidemiológicos posteriores han respaldado estas observaciones (Pal y col. 2018, Peters y col. 2017, Zhang y col. 2017). Otros estudios han mostrado también mecanismos que interrelacionan ambas patologías. Así la resistencia insulínica acelera la producción y acumulación del péptido βA, promoviendo aumentos de BACE1 y y-secretasa (Johnson y col. 2017, Kshirsagar y col. 2021, Wei y col. 2021). Por otro lado, la insulina y el péptido βA son sustratos de la enzima degradadora de la insulina y de la neprilisina, por lo que se ha sugerido que en presencia de altos niveles de insulina, tal y como ocurre en el proceso prediabético y en la DM2, la degradación del βA se puede ver comprometida (Chin-Chan y col. 2018, Esser y Zraika 2019). Además, las deficiencias en la señalización de insulina en el cerebro pueden llevar a una reducción de la actividad de Akt y a un incremento de la actividad de la GSK3β, de la fosforilación de tau y en consecuencia de la formación de ovillos neurofibrilares (Gabbouj y col. 2019). Asimismo, se ha demostrado la correlación entre la hiperglucemia, la resistencia a la insulina y el proceso inflamatorio, que eventualmente conducen a la neurodegeneración (Arnold y col. 2018). Por todo ello, se ha sugerido que la DM2 puede acelerar o empeorar la patología tipo Alzheimer (Chatterjee y Mudher 2018, Sun y col. 2020).

Por otro lado, a día de hoy el éxito de los tratamientos disponibles para la EA es muy limitado, por lo que cualquier avance a este nivel podría proporcionar una mejora significativa en el tratamiento de esta enfermedad. En este sentido y teniendo en cuenta las consideraciones descritas, es posible que el tratamiento con un fármaco antidiabético, como la LRGT, consiga mejorar los procesos cognitivos, reducir el daño vascular y mejorar la patología amiloide y tau en la EA. La posible relevancia de la LRGT para el tratamiento de la EA está actualmente en consideración en el ensayo ELAD. Sin embargo, hasta donde sabemos, no hay estudios que analicen el papel de la LRGT en la

patología cerebral y alteraciones cognitivas cuando EA y DM2 coexisten, tal y como suele observarse normalmente en la clínica. Por ello resulta de interés estudiar el efecto de la LRGT en un modelo murino mixto de EA y DM2, como es el ratón APP/PS1xdb/db.

5.2. OBJETIVOS

5.2.1 Objetivo general 1

Compendiar los estudios que analizan el papel de la LRGT en las alteraciones cognitivas y daño cerebral en pacientes con EA y en modelos murinos de la enfermedad.

Objetivos específicos

- Revisar los estudios preclínicos en modelos animales de EA que utilizan la LRGT.
- Analizar los estudios en pacientes con EA que usan la LRGT y revisar sus efectos en la patología cerebral y estado cognitivo.

5.2.2 Objetivo general 2

Analizar los efectos tras el tratamiento con LRGT a largo plazo (administrado entre las 6 y 26 semanas de edad) en las alteraciones metabólicas, cognitivas y de marcadores de daño cerebral en ratones APP/PS1xdb/db.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto a nivel metabólico del tratamiento a largo plazo con LRGT en el ratón APP/PS1xdb/db.
- Evaluar el efecto del tratamiento a largo plazo con LRGT en el ratón APP/PS1xdb/db a nivel neuropatológico, incluyendo daño neuronal, patología vascular, inflamatoria, amiloide y tau.
- Determinar el efecto del tratamiento a largo plazo con LRGT en los problemas de aprendizaje y memoria del modelo murino mixto APP/PS1xdb/db.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS

Disponemos de una colonia mixta como resultado del cruce de ratones APP/PS1 (Jackson Laboratories, ME, USA, Tg (APPswe, PSEN1dE9) 85Dbo, Stock No. 004462) y db/db (BKS, Cg-+*Lepr^{db}/+Lepr^{db}/OlaHds*, Harlam Laboratories, Boxmeer, Holand). Los ratones APP/PS1 presentan depósito de βA alrededor de los 4 meses de edad (Garcia-Alloza y col. 2006b, Ikram y col. 2020) y los ratones db/db son un KO funcional del receptor de leptina que sólo presenta fenotipo diabético en homocigosis. Los animales se agruparon según su genotipo: **Control** (APP/PS1$^{-/-}$ db/db$^{+/+}$, APP/PS1$^{-/-}$db/db$^{+/-}$), **APP/PS1** (APP/PS1$^{+/-}$db/db$^{+/+}$, APP/PS1$^{+/-}$db/db$^{+/-}$), **db/db** (APP/PS1$^{-/-}$db/db$^{-/-}$) y **APP/PS1xdb/db** (APP/PS1$^{+/-}$db/db$^{-/-}$) como se ha descrito previamente (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015).

En los estudios con LRGT (*Virtoza*, Novo Nordisk, Novo Allé, Dinamarca), el fármaco se administró vía subcutánea (Hansen y col. 2015) durante 20 semanas, comenzando a las 6 semanas de vida cuando la DM2 debuta en ratones db/db y hasta las 26 semanas, cuando la EA y la DM2 están completamente establecidas en el modelo mixto APP/PS1xdb/db. Con el fin de limitar los efectos adversos del tratamiento, los animales recibieron una dosis inicial de LRGT de 25µg/kg/día por vía subcutánea. Las dosis de fármaco se incrementaron diariamente durante la primera semana: 50, 100, 150, 200, 300µg/kg/día hasta alcanzar los 500µg/kg/día 7 días después de comenzar el tratamiento, tal y como se ha descrito previamente (Hansen y col. 2015). A partir de este momento la dosis de 500µg/kg/día de LRGT se mantuvo hasta el sacrificio de los animales en la semana 26. De modo paralelo, los animales Control recibieron tampón fosfato salino (PBS) (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) filtrado diariamente por vía subcutánea **(Figura 3)**.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado Animal de la Universidad de Cádiz de acuerdo con las Directrices para el cuidado y uso de animales de experimentación según la legislación vigente (Directiva de la Comisión Europea 2010/63/UE y Real Decreto 53/2013) **(Anexo 4)**.

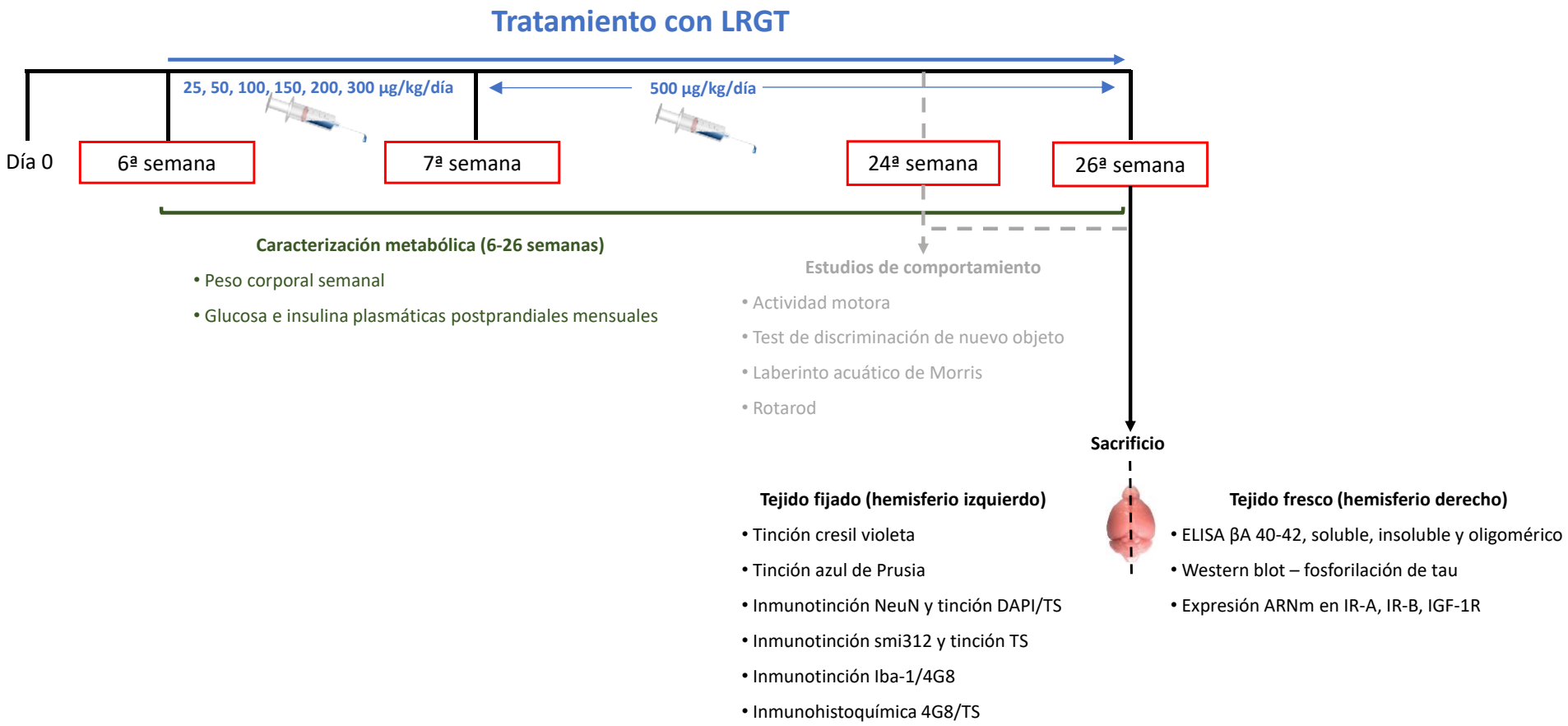


FIGURA 3 || Línea del tiempo que muestra la planificación experimental y los estudios *in vivo* y *postmortem* llevados a cabo. Tinción 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), tioflavina-S (TS), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ARN mensajero (ARNm), receptor de insulina A (IR-A) y B (IR-B), receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R).

6.2. CARACTERIZACIÓN METABÓLICA

Los animales se pesaron semanalmente y se determinaron los niveles de glucosa e insulina mensualmente. La glucosa se midió con un glucómetro Optimun Xceed (Abbot, Reino Unido) y sus correspondientes tiras reactivas Freestyle Optium (Abbot, Reino Unido). Se extrajo sangre de la cola del ratón con tubos con potasio-EDTA cada cuatro semanas (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). Las muestras de sangre se centrifugaron durante 7 minutos a 6.500 r.p.m a 4°C para determinar los niveles de insulina en la fracción plasmática mediante ELISA ultrasensible (Mercodia Inc., Winston Salem NC, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La fracción de plasma se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

6.3. ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO

Para valorar los procesos de aprendizaje y memoria de los animales en estudio se realizó la prueba del laberinto acuático de Morris (MWM) para comprobar la capacidad de aprendizaje y la memoria espacial, la prueba de campo abierto y rotarod para evaluar la actividad motora y el test de discriminación de nuevo objeto (NOD) para evaluar la memoria episódica.

6.3.1 Laberinto acuático de Morris

El aprendizaje y memoria espacial se evaluaron tal y como se ha descrito previamente con mínimas modificaciones (Bromley-Brits y col. 2011, Tian y col. 2019). El laberinto consiste en una piscina de agua (teñida con caolitina) de 0.95m de diámetro, dividida virtualmente en cuatro cuadrantes marcados con claves visuales en las paredes que el animal usó para orientarse. La plataforma de escape se situó 1-2cm por debajo de la superficie y se camufló con caolitina disuelta en agua, a una temperatura de 21±1°C. Con esta prueba el animal aprende la localización de la plataforma siguiendo las pistas geométricas del exterior de la piscina. La prueba se llevó a cabo en dos fases: la adquisición y la retención. La adquisición estuvo compuesta por 4 ensayos diarios con un intervalo entre los ensayos de 10 minutos, durante 4 días consecutivos con la plataforma sumergida en el cuadrante dos. El animal nadó libremente durante un tiempo máximo de 60 segundos en cada ensayo. Si tras ese este tiempo el animal no encontró la plataforma se situó manualmente sobre ella durante 10 segundos. El tiempo

empleado y la distancia recorrida para llegar hasta la plataforma se grabaron y analizaron con el software Smart (Panlab, Barcelona, España). En la fase de retención, se quitó la plataforma y se depositó el ratón en la piscina, dejándolo nadar durante 60 segundos, midiendo el tiempo, la velocidad de natación y la distancia recorrida en cada cuadrante. Esta fase se realizó tanto a las 24 como a las 72 horas del último ensayo de adquisición. Todo el estudio se grabó y analizó con el software Smart (Panlab, Barcelona, España) **(Figura 4)**.

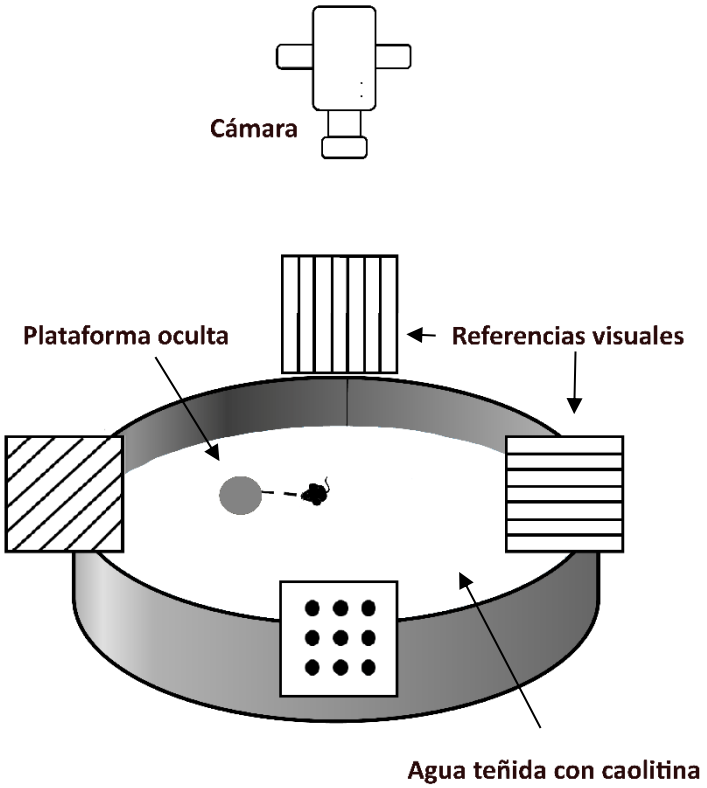


FIGURA 4 || Representación esquemática del equipo del laberinto acuático de Morris.

6.3.2 Actividad motora y test de discriminación de nuevo objeto

El primer día los animales pasaron por una fase de habituación a la caja de registro en la que se realizó posteriormente el test de discriminación de nuevo objeto (22cm ancho x 44cm largo x 40cm alto) **(Figura 5.A)**. Durante los 30 minutos de la habituación se evaluó la actividad motora espontánea de los ratones, midiendo la distancia recorrida por los animales en este tiempo.

El segundo día de estudio de comportamiento los animales se sometieron a una fase de habituación con objetos que no se usaron en el test NOD (trapezoide rojo y tapón amarillo) **(Figura 5.B)** durante 5 minutos. El tercer día, durante la fase de adquisición, se realizaron dos ensayos simples y un test de 5 minutos. El tiempo transcurrido entre el último ensayo y el test fue de 30 minutos. En el primer ensayo el animal se colocó durante 5 minutos en la caja, con 4 bolas azules en disposición triangular **(Figura 5.C)** y en el ensayo dos el animal volvió a la caja durante 5 minutos, con 4 conos rojos dispuestos en rectángulo **(Figura 5.D)**. El test tuvo lugar 30 minutos después y el animal se colocó en la caja con dos copias del objeto del ensayo dos (conos rojos, objetos recientes), colocados en dos de las esquinas y dos copias de los objetos del ensayo uno (objetos antiguos, bolas azules) colocados uno de ellos en la misma posición (objeto antiguo no desplazado) y el otro en una nueva posición (objeto antiguo desplazado) **(Figura 5.E)**. A partir de la grabación se analizó la memoria episódica integrada para los paradigmas "qué", "dónde" y "cuándo" con el software Smart (Panlab, Barcelona, España), tal y como se ha descrito previamente (Dere y col. 2005) con pequeñas modificaciones. "Qué" se define como la diferencia en el tiempo de exploración de objetos nuevos y conocidos, "dónde" se define como la diferencia en el tiempo de exploración de los objetos desplazados y no desplazados y "cuándo" se define como la diferencia en el tiempo de exploración de los objetos antiguos no desplazados y los objetos recientes no desplazados.

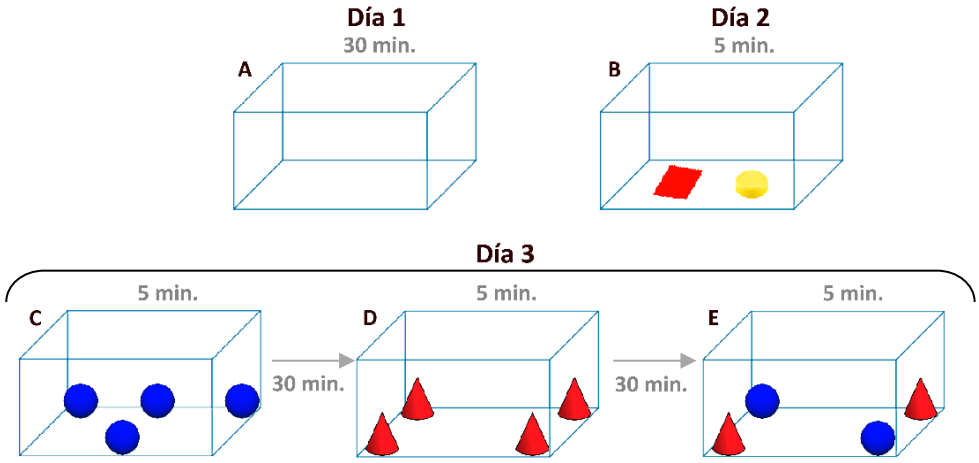


FIGURA 5 || Representación esquemática de la distribución de objetos y protocolo experimental para el test de discriminación de nuevo objeto.

6.3.3 Rotarod

La coordinación motora se evaluó mediante rotarod (Panlab Harvard Apparatus, Madrid, España). El animal se puso de forma horizontal en la rueda (3cm de diámetro y 5.7cm de ancho), en la que el animal debe andar para no caer. En la fase de entrenamiento los animales se pusieron en la rueda de rotarod durante 4 minutos a una velocidad de 4 r.p.m. Durante el test, la velocidad incrementó de 4 a 40 r.p.m durante 1 minuto. Se recogieron los datos del tiempo que el animal estuvo en la rueda y la velocidad a la que giraba cuando el animal caía.

6.4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS Y TEJIDO

Los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) (90mg/kg). Se tomaron 200µl de sangre mediante punción cardiaca, que se centrifugaron a 6.500 r.p.m durante 7 minutos. Se retiró el plasma que se conservó a -80°C.

Se extrajeron y pesaron los cerebros. El hemisferio cerebral izquierdo se fijó en paraformaldehido al 4% (pH 7,4; 4°C) durante dos semanas y posteriormente se realizaron secciones coronales, de 30µm, con un microtomo de congelación (-30°C) (Thermo Scientific, Microm KS 34, Alemania) con el fin de utilizarlas para los estudios histológicos. Las secciones se preservaron a -20°C en tampón fosfato 0,1M/glicerol al 50% hasta su uso. El hemisferio derecho se diseccionó (corteza, hipocampo y estriado) y congeló inmediatamente a -80ºC hasta su uso.

6.4.1 Histomorfología cerebral: tinción cresil violeta

Se realizaron cortes coronales de 30µm a 1.5, 0.5, -0.5, -1.5, -2.5 y -3.5mm, tomando Bregma como referencia, con la ayuda de un atlas histológico (Paxinos y Franklin 2004). Las secciones se montaron en portaobjetos de adhesión superfrost (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), se sumergieron en alcohol al 70% durante 15 minutos, para incubarlos posteriormente en una solución de cresil violeta (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) al 0.5% durante 10 minutos. Las secciones se aclararon en agua destilada y se sumergieron en una solución de etanol absoluto y ácido acético (0.25%) durante 6 minutos. Finalmente, se realizaron aclarados sucesivos en etanol absoluto y xilol (Sigma Aldrich, Madrid, España) durante 2 minutos y las secciones se montaron con DPX (Sigma Aldrich, Madrid, España). Estas secciones se fotografiaron en un microscopio Olympus

Bx60 (Olympus, Tokio, Japón) acoplado a una cámara Olympus DP71. A partir de las imágenes se cuantificó el área total de cada sección, así como las áreas de la corteza. Todas las medidas se realizaron usando los softwares Adobe Photoshop Elements e Image J, tal como se ha descrito previamente (Ramos-Rodriguez y col. 2013).

6.4.2 Daño vascular: tinción azul Prusia

Para el estudio de la patología vascular se realizó una cuantificación de hemorragias mediante tinción azul de Prusia tal y como se ha descrito previamente con mínimas modificaciones (Desestret y col. 2009). Se montaron en un portaobjetos de adhesión superfrost (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) 6 secciones de cada animal anexas a las utilizadas para la tinción cresil violeta. Las secciones se deshidrataron a temperatura ambiente y se incubaron en solución azul de Prusia (Sigma Aldrich, Madrid, España) en proporción de 20% ácido clorhídrico y 10% ferrocianato potásico durante 30 minutos. Se enjuagaron con agua destilada y se rehidrataron con PBS (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) durante 5 minutos. Una vez secas, se sumergieron en una solución de rojo neutro (Sigma Aldrich, Madrid, España) (rojo neutro al 1% en ácido acético al 1%) durante 2 minutos. El tejido se aclaró y se deshidrató con concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 90 y 100%). Tras un aclarado en xilol (Sigma Aldrich, Madrid, España) de 2 minutos, las secciones se cubrieron con DPX (Sigma Aldrich, Madrid, España) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las secciones se fotografiaron con una cámara Olympus DP71 acoplada a un microscopio Olympus Bx60 (Olympus, Tokio, Japón). Las imágenes se analizaron usando los softwares Photoshop Elements e Image J para cuantificar el número, el tamaño de cada hemorragia y la carga hemorrágica (% de área ocupada por hemorragias) en corteza e hipocampo.

6.4.3 Patología neuronal

6.4.3.1 Immunotinción para NeuN y tinción 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y TS

Se utilizaron seis secciones de 30µm contiguas a las utilizadas en las tinciones anteriores. Se realizó un bloqueo con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma Aldrich, Lyon, Francia) al 3% y Tritón X-100 (Sigma Aldrich, Madrid, España) al 0.5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con anticuerpo anti-NeuN monoclonal de ratón (Sigma, St. Louis, MO, USA) (Ref.MAB377) 1:200 diluido en

PBS (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) con BSA al 0.5% (Sigma Aldrich, Lyon, Francia) durante la noche a 4°C. Las secciones se lavaron con PBS (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) 0.1M y se incubaron con el anticuerpo secundario burro anti-ratón Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Ref. A21203) (1:1000) diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido del marcaje de núcleos con DAPI 1 mg/ml (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) (1:3000) diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la visualización de placas amiloides se empleó tinción de TS (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) (Ref. T1892) a 0.01% en H_2O/etanol (1:1) durante 10 minutos. Las secciones se montaron y fotografiaron utilizando el microscopio Olympus Bx60 con la cámara Olympus DP71 (Olympus, Tokio, Japón). Se tomaron cinco imágenes de corteza y dos imágenes de hipocampo y en cada imagen se seleccionaron cinco regiones de interés (ROI) de 4252,24µm^2 cada una, como se ha descrito anteriormente (Infante-Garcia y col. 2018, Ramos Rodriguez y col. 2015). Se calculó el porcentaje de células NeuN-positivas respecto al número total de células marcadas con DAPI en corteza e hipocampo, cerca (<50µm del borde de la placa) y lejos (>50µm) de placas, usando el software libre Image J.

6.4.3.2 Inmunotinción smi312 y tinción con TS

La curvatura axonal se determinó mediante tinción inmunohistoquímica de smi312 como se ha descrito previamente (Infante-Garcia y col. 2017b) con mínimas modificaciones. Las secciones se pretrataron con peróxido de hidrógeno al 3% y Tritón X–100 (Sigma Aldrich, Madrid, España) al 0.5% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con BSA (Sigma Aldrich, Lyon, Francia) al 3% durante 1 hora. Se incubaron las secciones con smi312 (Biolegend, San Diego, CA, EEUU) (Ref. 837904) (1:1000) diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo cabra anti-ratón Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, EEUU) (Ref. A11005) (1:200), en BSA (Sigma Aldrich, Lyon, Francia) al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se visualizaron mediante tinción con TS (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) (Ref. T1892) a 0.01% en H_2O/etanol (1:1) durante 10 minutos. Las secciones montadas se fotografiaron en el microscopio de fluorescencia Laser Olympus U-RFL-T (Olympus, Tokio, Japón) y se procesaron con el sofware MMIcellTools. La curvatura neuronal se calculó con el software libre Image J dividiendo la longitud real

entre 2 puntos de un axón de al menos 20µm de longitud, entre la distancia en línea recta que separa ambos puntos, tal y como se ha descrito previamente (Garcia-Alloza y col. 2007).

También se determinó el efecto de las placas amiloides en la curvatura neuronal. Para ello se midió la distancia a las placas en 3 puntos a lo largo de un axón y se tomó el valor medio. Se consideraron próximos a placa aquellos axones cuya distancia media a la placa era <50µm. En animales sin placas, se comparó la curvatura de los axones con la curvatura medida a más de 50µm de la placa en ratones APP/PS1 y APP/PS1xdb/db, como se ha descrito previamente (Garcia-Alloza y col. 2007). Se analizaron al menos 40 axones en cada animal para obtener al menos 300 axones por grupo. La curvatura neuronal y la distancia a las placas se midieron utilizando el software Image J.

6.4.4 Neuroinflamación: inmunotinición Iba-1/4G8

Se utilizaron 6 secciones de 30µm contiguas a las utilizadas en tinciones anteriores y se pretrataron con ácido fórmico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) al 70% durante 10 minutos y posterior bloqueo con BSA (Sigma Aldrich, Lyon, Francia) al 3% y Tritón X–100 (Sigma Aldrich, Madrid, España) al 0.5% durante 1 hora. Las secciones se incubaron con el anticuerpo anti-Iba 1 (Wako, Osaka, Japón) (Ref. 019-19741) (1:1000) para marcar microglía y 4G8 (Biolegend, London, Reino Unido) para marcar amiloide (Ref. 800702) (1:2000) en BSA (Sigma Aldrich, Lyon, Francia) al 0,5% durante la noche a 4°C. Posteriormente las secciones se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo secundario burro anti-conejo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU) (Ref. A21206) (1:1000) y burro anti-ratón Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU) (Ref. A21203) (1:1000). Las imágenes se obtuvieron con el microscopio de fluorescencia Laser Olympus U-RFL-T (Olympus, Tokio, Japón) y el software MMIcellTools. Se tomaron cinco imágenes de corteza y dos imágenes de hipocampo y, en cada imagen se seleccionaron cinco ROI de 4224,94µm^2 cada una, como se ha descrito previamente (Ramos Rodriguez y col. 2015). Para analizar la carga de microglía (% de área cortical o del hipocampo cubierta por microglía) cerca (<50µm) y lejos (>50µm) de placas se utilizó el software Image J.

6.4.5 Patología amiloide

6.4.5.1 Inmunohistoquímica para βA: 4G8/TS

Las secciones se pretrataron con ácido fórmico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) al 70% durante 10 minutos y se incubaron con BSA (Sigma Aldrich, Lyon, Francia) al 0.5% durante 1 hora. Seguidamente se realizó una incubación con el anticuerpo primario 4G8 (Biolegend, London, Reino Unido) (Ref. 800702) (1:2000) en BSA (Sigma Aldrich, Lyon, Francia) al 3% durante la noche a 4°C para marcar amiloide fibrilar. Tras los aclarados, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario burro anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU) (Ref. A21206) a una concentración 1:1000 durante 2 horas a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron adicionalmente en con TS (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) (Ref. T1892) al 0.01% en H_2O/etanol (1:1) durante 10 minutos. Las secciones se montaron con Fluoro-Gel (Invitrogen, Electron Microscopy Science, Hatflied, Reino Unido) en portaobjetos de adhesión superfrost (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y se fotografiaron con un microscopio fluorescente Laser Olympus U-RFL-T (Olympus, Tokio, Japón). Con el software MMIcellTools se adquirieron las imágenes, y con el sofware Image J se analizaron para cuantificar el número y tamaño de las placas y la carga total de placas amiloides. También se cuantificó la presencia de vasos penetrantes CAA positivos por mm^2 de corteza cerebral.

6.4.5.2 ELISA βA 40 y 42 soluble, insoluble y oligomérico

Los niveles de βA40 y 42 soluble e insoluble se cuantificaron en corteza e hipocampo de ratones APP/PS1 y APP/PS1xdb/db mediante ELISA (Wako, Osaka, Japón) (Aβ40, Ref. 294-62501; Aβ42, Ref. 290-62601) tal y como se ha descrito previamente (Garcia-Alloza y col. 2006b, Infante-Garcia y col. 2018) con pequeñas modificaciones. Para la extracción, el tejido se homogeneizó en tampón de lisis RIPA (Pierce TM, Thermo Scientific, Madrid, España) con cóctel de inhibidor de proteasas y fosfatasas Halt™ (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y se centrifugó (14.500 r.p.m) durante 12 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se diluyeron 1:300 para medir los niveles de βA40 y 42 solubles. El pellet resultante se trató con 50µl ácido fórmico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) al 70% en agua destilada y se centrifugó a 14.500 r.p.m durante 10 minutos.

La fracción insoluble fue neutralizada con Tris 1M (pH 11) y diluida 1:30 para su uso. Los βA40 y 42 proporcionados en los kits se usaron para realizar las curvas patrón.

Los oligómeros βA se cuantificaron usando el kit de ensayo de oligómeros βA (específico de 82E1) (IBL, Hamburgo, Alemania). La corteza se homogenizó en solución salina tamponada (1/5 p/v) con Tris (TBS; Tris-HCl 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,5) que contenía un cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasas Halt™ (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). A continuación se centrifugaron los homogeneizados (14.500 r.p.m) durante 60 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió y se diluyó con tampón enzimático (1:2) proporcionado en el kit.

Todas las absorbancias se midieron espectrofotométricamente a 450nm (Biotek instruments, Burlington VT, EEUU) y los datos se expresaron en pmol/g tejido.

6.4.6 Patología tau: fosforilación de tau

La fosforilación de tau, como marcador de daño neuronal de la EA, se evaluó mediante western blot en la corteza e hipocampo tal y como se ha descrito previamente (Infante-Garcia y col. 2017b), con pequeñas modificaciones. El tejido se homogeneizó en tampón de lisis RIPA (Pierce TM, Thermo Scientific, Madrid, España) suplementado con un cóctel de inhibidores de fosfatasas y proteasas Halt ™ (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). El homogenado se sonicó y centrifugó a 4°C durante 5 minutos a 15.000 r.p.m y se recogió el sobrenadante. La cantidad de proteína se cuantificaron por el método Bradford (Bio-Rad, Madrid, España). Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 10% seguido de una trasferencia electroferética a membranas de transferencia de fluoruro de polivinilideno (Bio-Rad, Madrid, España). Las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) durante 1 hora. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti-fosfo-tau de ratón (clon AT8) (Thermo Fisher Scientific, Agawan, MA, EE. UU.) (Ref. MN1020), diluido 1:1000 en solución de bloqueo, durante una noche a 4°C. Las membranas se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) (Ref. WP20006) (1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron y se detectó la señal mediante la reacción con sustrato quimioluminiscente Novex AP en Chemidoc (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España)

y el Chemidoc (Bio-rad, Madrid, Spain). Se realizó el stripping de las membranas durante 12 minutos a 37°C en agitación con el Stripping Buffer 4x (Thermo ThermoFisher Scientific, Madrid, España). Tras la retirada de la solución de strippipng se realizaron lavados con agua destilada. Posteriormente se añadió la solución de bloqueo a las membranas durante 1 hora. Después, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-tau-total de conejo (DAKO, Glostrup, Dinamarca) (Ref. P10636) diluido en solución de bloqueo (1:1000) siguiendo el procedimiento anterior. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-conejo (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) (Ref. WP20007) (1:1000). Tras la detección de la señal y el stripping de las membranas se procedió a la incubación con el anticuerpo primario anti-β-actina de ratón (Sigma Aldrich, OR, EEUU) (Ref. A5441) (1:1000) en solución de bloqueo durante una noche a 4°C. Las membranas se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) (Ref. WP20006) (1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los inmunoblots se cuantificaron calculando la densidad óptica de cada banda de proteína y posteriormente se normalizaron con las bandas de β-actina usando el software Image J. El ratio fosfo-tau/tau total se representó como porcentaje de los valores Control.

6.4.7 Expresión de ARN mensajero del receptor de insulina A (IR-A) y B (IR-B) y del receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R)

Para el análisis de la expresión de rt-qPCR se aisló el ARN de la corteza utilizando Trizol ™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante y se resuspendió en agua purificada sin nucleasas. El ARN se cuantificó usando un fluorímetro Synergy ™ Mx (BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, EEUU). Se obtuvo ADN complementario a partir de 500ng de ARN utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript ™ (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EEUU) en un termociclador Techne Genius (Techne Ltd., Cambridge, Reino Unido). La mezcla de reacción de RT-qPCR de 15µl contenía 7,5µl de iTaq ™ 2X Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EEUU), 0,3µl de cada cebador directo e inverso con un volumen final de 200nmol (para IR-varA, IR-varB y rRNA18S), 1,35µl de cada cebador quedando a una concentración de 900nmol (para IGF-1R), 1µl de la muestra y completando hasta los 15µl del volumen de reacción con agua libre de DNasa/RNasa. El perfil térmico de PCR incluyó

40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, hibridación a temperatura de acuerdo con cada conjunto de cebadores (61°C para IR-varA, 59°C para IR-varB, 64°C para IGF-I y 55°C para rRNA18S) durante 15 segundos. Finalmente se incluyó una extensión a 72°C durante 20 segundos para el análisis de la curva de *melting*. Cada muestra se analizó por triplicado. El nivel de ARNm de rRNA18S se utilizó como control interno. Los valores de cuantificación relativa de la expresión de ARNm se calcularon como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mediante el método Livak. En primer lugar, los valores de Ct de control interno se restaron a los valores de Ct del gen de interés para obtener un valor de ΔCT. A continuación se evaluó la expresión relativa del gen de interés utilizando la expresión $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde el valor de ΔΔCt se obtuvo restando el ΔCt del calibrador de cada ΔCT, utilizando la media del control (animales de control) como calibrador. Los cebadores de oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron diseñados por BLAST y se obtuvieron de Merck KGaA (Merck, Madrid, España) para IR^{-varA} (FW: TTTGTCCCCAGGCCATCC-RV: ATCTGGAAGTGTGAGTGTGG), IR^{-varB} (FW: AATGGTGCCGAGGACAGTA-RV:ATCTGGAA GTGTGAGTGTGG) and IGF-I (FW:CACAACTACTGCTCCAAAGACAAA-RV:TTTTCCGTCACCT CCTCCAC); rRNA18S (FW:CTCAACACGGGAAACCTCAC-RV:CTCAACACGGGAAACCTCAC).

6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los estudios *postmortem* y el test de NOD se analizaron mediante ANOVA de un criterio para muestras independientes (previa comprobación de normalidad), seguida de la prueba b de Tukey o Tamhane, dependiendo del test de Levene para homogeneidad de varianzas. En la fase de adquisición del MWM usamos ANOVA de dos criterios para medidas repetidas (grupoXdía). También utilizamos ANOVA de dos criterios en los estudios metabólicos (grupoXsemana). Para todos los análisis estadísticos se utilizó el software SPSS v.24.

VII. RESULTADOS

7.1. LA LRGT MEJORÓ LAS ALTERACIONES METABÓLICAS EN RATONES MODELO DE DM2 Y DE EA-DM2

7.1.1 Los niveles de glucosa posprandiales se redujeron en los ratones diabéticos tratados

Los niveles de glucosa postprandiales se monitorizaron cada 4 semanas, desde las 6 a las 26 semanas de edad. Cuando se analizó la evolución del nivel de glucosa a lo largo del tratamiento, no detectamos una interacción grupoXsemana estadísticamente significativa para muestras independientes [$F_{(35,380)}$=1.18, p=0.227]. Sin embargo, una evaluación adicional de los días individuales reveló que el tratamiento con LRGT redujo los niveles de glucosa en ratones diabéticos (db/db y APP/PS1xdb/db) **(Figura 6)**. En la semana 6 al inicio del estudio, la glucosa plasmática estaba significativamente aumentada tanto en los ratones db/db como en los ratones APP/PS1xdb/db en comparación con los ratones Control y APP/PS1 [$F_{(7,63)}$=4.79, ##p<0.01 Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, ╪╪p<0.01 vs. Control]. A las 10 semanas de edad, los niveles de glucosa eran significativamente más altos en los ratones diabéticos (db/db y APP/PS1xdb/db) no tratados cuando se compararon con los ratones Control y modelo de EA, así como con los animales diabéticos tratados con LRGT [$F_{(7,64)}$=15.74, ††p<0.01 Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT; ‡‡p<0.001 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT y db/db-LRGT; ŦŦp<0.01 vs. Control-LRGT]. Las diferencias en los niveles de glucosa entre los ratones diabéticos no tratados (db/db y APP/PS1xdb/db) y los ratones no diabéticos se mantuvieron hasta la semana 26, observándose una disminución generalizada de los niveles de glucosa en los animales modelo de DM2 y de EA-DM2 tratados con LRGT. A las 14 semanas de edad se observó un perfil similar al descrito tras 4 semanas de tratamiento con LRGT (semana 10) y la LRGT consiguió limitar la hiperglucemia en los animales modelo de DM2 (db/db) y modelo de EA-DM2 (APP/PS1xdb/db) [$F_{(7,64)}$=14.065; ††p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRG; ŦŦp<0.01 vs. Control-LRGT]. A las 18 semanas, los niveles de glucosa en los ratones APP/PS1xdb/db-LRGT eran similares a los detectados en los animales Control y APP/PS1 [$F_{(7,64)}$=9.31, ††p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT, APP/PS1xdb/db-LRGT]. A las 22 y 26 semanas el perfil fue similar al descrito en las

semana 18 (semana 22: [$F_{(7,64)}$=8.14, ‡‡p=0.004 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT]; semana 26: [$F_{(7,60)}$=5.57, ##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT]). El control glucémico se mantuvo en los ratones db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT hasta el final del tratamiento (26 semanas de edad).

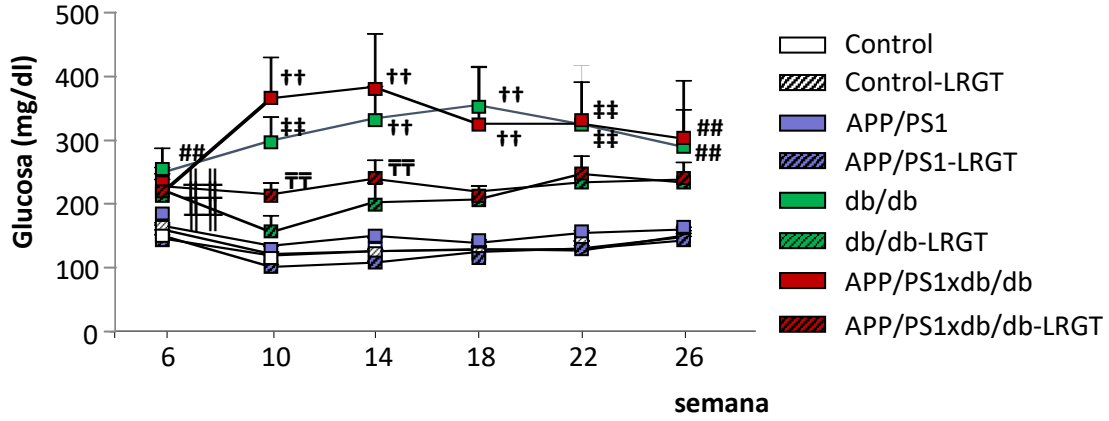


FIGURA 6 || El tratamiento a largo plazo con LRGT redujo significativamente los niveles de glucosa posprandial en ratones modelo de DM2 y de EA-DM2. La glucosa plasmática se midió cada 4 semanas en animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. La LRGT redujo significativamente los niveles de glucosa posprandial en ratones diabéticos (##p<0.01 Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT; ╫╫p<0.01 vs. Control; ††p<0.01 Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT; ‡‡p<0.001 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT y db/db-LRGT; ŦŦp<0.01 vs. Control-LRGT). Los datos son representativos de 5-12 animales y las diferencias estadísticamente significativas se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey o Tamhane, según se requería.

7.1.2 Los niveles de insulina se mantuvieron con el tratamiento con LRGT

Cuando se analizaron los niveles de insulina, se detectó una interacción grupoXsemana estadísticamente significativa mediante ANOVA de dos criterios para muestras independientes a lo largo del tratamiento [$F_{(35,384)}$=2.64, p<0.01]. El análisis de las semanas individuales reveló un aumento de los niveles de insulina a las 6 semanas de edad en los animales diabéticos, que alcanzó diferencias estadísticamente significativas en los animales modelo de EA-DM2 al compararlos con los animales Control y modelo de EA [$F_{(7,64)}$=3.83, ##p<0.01 Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT] **(Figura 7)**.

El hecho de que los niveles de insulina aumentaran significativamente en los animales modelo de EA-DM2 (APP/PS1xdb/db) sugirió un compromiso metabólico más temprano en el modelo mixto que requiere un aumento en la actividad pancreática y de los niveles de insulina. A las 10 semanas de edad, los ratones diabéticos sin tratamiento, tanto db/db como APP/PS1xdb/db presentaron niveles de insulina mayores que los animales

Control y APP/PS1. Sin embargo, las diferencias únicamente alcanzaron significación estadística en los animales diabéticos (db/db y APP/PS1xdb/db) tratados con LRGT, lo que sugiere que el tratamiento con LRGT contribuye a mantener niveles elevados de insulina con el fin de controlar los niveles de glucosa [$F_{(7,62)}$=5.42, ##p<0.01 Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT]. Esta situación se mantuvo desde las 14 a las 26 semanas de edad y la LRGT ayudó a aumentar los niveles de insulina en los ratones diabéticos (db/db y APP/PS1xdb/db) (semana 14 [$F_{(7,61)}$=10.53, ⊥⊥p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db y APP/PS1xdb/db; ⩢p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, APP/PS1xdb/db]; semana 18 [$F_{(7,65)}$=10.75, ⊥⊥p<0.01 Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db y APP/PS1xdb/db; ##p<0.01 Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT]; semana 22 [$F_{(7,66)}$=10.60, ⊥⊥p<0.001 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db y APP/PS1xdb/db; ⩢p<0.01 vs Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, APP/PS1xdb/db]; semana 26 [$F_{(7,66)}$=7.77, ⊥⊥p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, APP/PS1xdb/db; ##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT]).

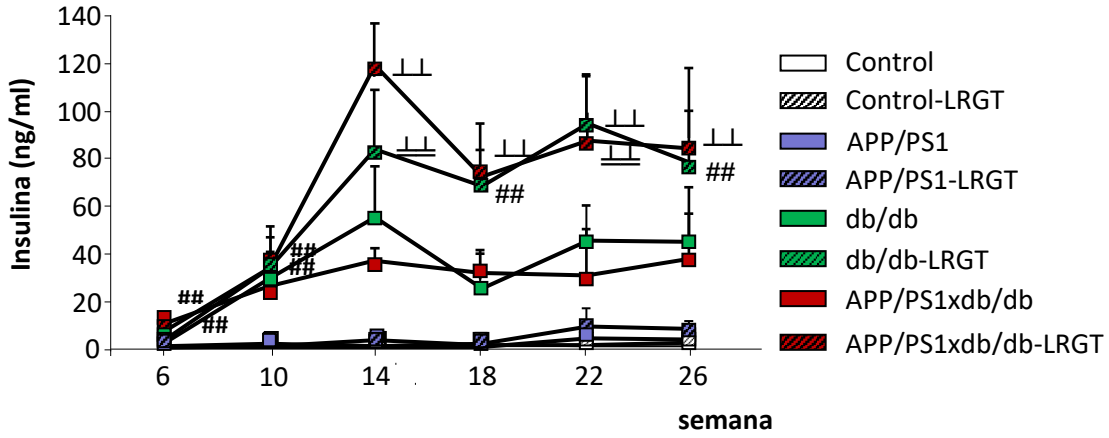


FIGURA 7 || El tratamiento a largo plazo con LRGT ayudó a mantener los niveles de insulina en los ratones modelo de DM2 y de EA-DM2. La insulina se midió cada 4 semanas en los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT**.** Los niveles de insulina estaban aumentados en los animales diabéticos y el tratamiento con LRGT contribuyó a mantener la hiperinsulinemia (##p<0.01 Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT; ⊥⊥p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db y APP/PS1xdb/db; ⩢p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT y APP/PS1xdb/db). Los datos son representativos de 5 a 12 animales y las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguido de la prueba b de Tukey o Tamhane, según se requería.

7.1.3 El peso corporal de los animales modelo de EA-DM2 se mantuvo con el tratamiento con LRGT

Se detectó una interacción estadísticamente significativa grupoXsemana mediante ANOVA de dos criterios para muestras independientes cuando se analizó el peso corporal [$F_{(35,400)}$=3.13, **p<0.01]. Una evaluación adicional de las semanas individuales reveló que el tratamiento con LRGT ayudó a mantener el peso corporal en ratones caquécticos APP/PS1xdb/db, como se ha observado previamente con otros tratamientos antidiabéticos (Hierro-Bujalance y col. 2020b, Infante-Garcia y col. 2018) **(Figura 8)**.

Al inicio del estudio, en la semana 6, los ratones diabéticos no tratados (db/db y APP/PS1xdb/db) tenían sobrepeso en comparación con los ratones no diabéticos (Control y APP/PS1) [$F_{(7,67)}$=18.57, ##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT]. En la semana 10, todos los ratones diabéticos, tratados y no tratados, presentaron un peso corporal significativamente mayor en comparación con los animales Control y APP/PS1 [$F_{(7,67)}$=30.997, ##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT] y estas diferencias se mantuvieron hasta la semana 18 (semana 14 [$F_{(7,67)}$=33.39, ##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT]; semana 18 [$F_{(7,67)}$=25.93, ##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT]).

En la semana 22, los ratones APP/PS1xdb/db no tratados todavía tenían sobrepeso en comparación con los animales Control y APP/PS1 [$F_{(7,66)}$=43.63, ⊥⊥p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT y APP/PS1xdb/db, ##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT]; pero se comenzó a detectar una ligera reducción del peso corporal, indicativo del estado caquéctico de estos animales, como se ha descrito anteriormente (Hierro-Bujalance y col. 2020b, Infante-Garcia y col. 2018). Sin embargo, la LRGT ayudó a mantener el peso corporal de los ratones modelo de EA-DM2 (APP/PS1xdb/db), evitando la pérdida de peso desde la semana 22 hasta el final del estudio (26 semanas) [$F_{(7,66)}$=37.44, ⊥⊥p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT y APP/PS1xdb/db, ##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT].

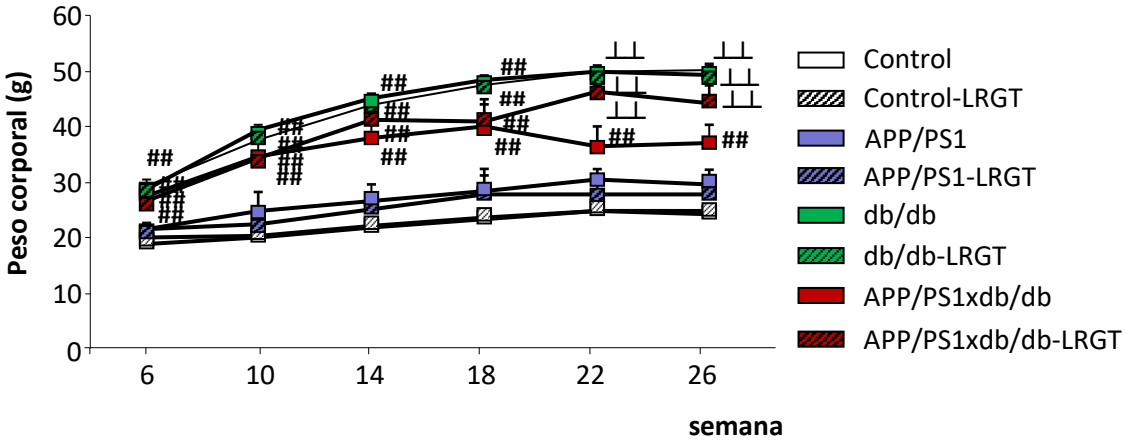


FIGURA 8 || El tratamiento a largo plazo con LRGT mantuvo el peso corporal de los animales modelo de EA-DM2. El peso corporal se midió cada 4 semanas en los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. La LRGT mantuvo el peso corporal en los animales APP/PS1xdb/db (##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT; ⊥⊥p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT y APP/PS1xdb/db). Los datos son representativos de 5 a 12 animales y las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey o Tamhane, según se requería.

7.2. LA LRGT MEJORÓ EL DETERIORO COGNITIVO EN RATONES APP/PS1xdb/db

7.2.1 La LRGT mejoró la memoria espacial en el MWM

La evaluación del comportamiento comenzó en la semana 24 de vida de los animales, después de 18 semanas de tratamiento con LRGT (500µg/kg/día) y finalizó en la semana 26 de vida de los animales. Cuando se analizó la memoria espacial en la fase de adquisición del MWM no se detectó una interacción estadísticamente significativa grupoXdía mediante ANOVA de dos criterios para muestras independientes al medir el tiempo que los animales requerían para localizar la plataforma [$F_{(21,1113)}$=0.985, p=0.479]. Sin embargo, la evaluación de los días individuales reveló que el deterioro cognitivo en los ratones modelo de DM2 y de EA-DM2 mejoraba significativamente con el tratamiento con la LRGT **(Figura 9)**.

El día 1 de la fase de adquisición, los ratones Control, APP/PS1 y db/db no tratados tardaron un tiempo similar en aprender y recordar el lugar donde se situaba la plataforma. Por su parte, los animales modelo de EA-DM2 (APP/PS1xdb/db) sin tratamiento emplearon más tiempo para encontrar la localización de la plataforma en comparación con el resto de animales a estudio. El tratamiento con LRGT ayudó a disminuir el tiempo para localizar la plataforma en los animales APP/PS1xdb/db aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas [$F_{(7,281)}$=4.65, ††p<0.01 vs.

Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db y db/db-LRGT]. Este compromiso de la memoria también se observó en los días 2 a 4 de la fase de adquisición para los ratones modelo de DM2 y de EA-DM2 (db/db y APP/PS1xdb/db) no tratados, al compararlos con los ratones Control y modelo de EA tratados y no tratados, y los ratones modelo de DM2 y de EA-DM2 tratados con LRGT (día 2 [$F_{(7,273)}$=6.205, ##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT, ŦŦp<0.01 vs. Control y Control-LRGT]; día 3 [$F_{(7,282)}$=5.36, ##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT, ŦŦp<0.01 vs. Control y Control-LRGT]; día 4 [$F_{(7,277)}$=9.24, ‡‡p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT, ##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT, ŦŦp<0.01 vs. Control y Control-LRGT]). Los ratones diabéticos (db/db) tratados con LRGT mostraron cierta mejoría, aunque no alcanzaron los valores de referencia de los animales Control. En el caso de los animales modelo de EA-DM2 (APP/PS1Xdb/db) tratados con la LRGT se observó una mejora significativa que alcanza niveles de animales Control en el día 4 de la prueba MWM **(Figura 9)**.

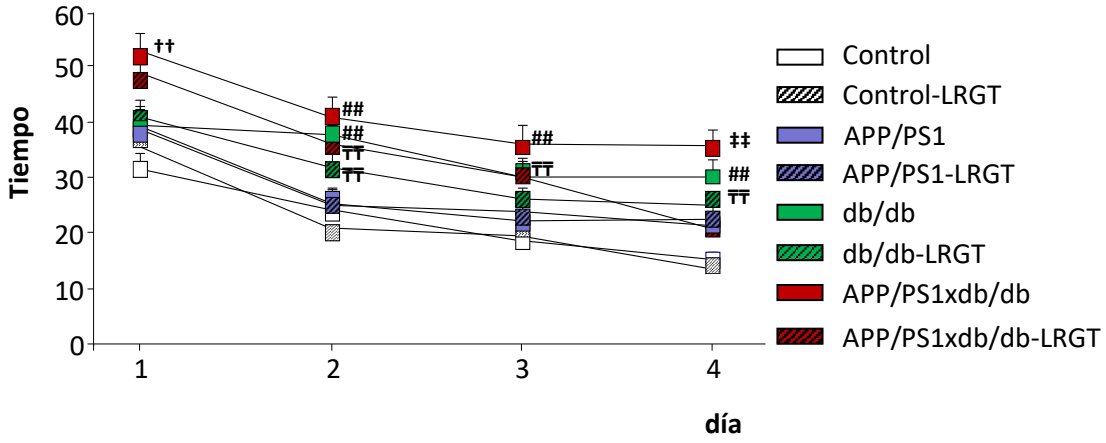


FIGURA 9 || El tratamiento con LRGT ayudó a mejorar el aprendizaje en el MWM de los ratones diabéticos. La LRGT limitó las alteraciones cognitivas observadas en la fase de adquisición en el MWM (††p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db y db/db-LRGT; ##p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT, ŦŦp<0.01 vs. Control y Control-LRGT, ‡‡p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT). Los datos son representativos de 5 a 12 animales y las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey o Tamhane, según se requería.

En la fase de retención del MWM, 24 horas tras concluir la fase de adquisición, se observó cierto compromiso en los animales modelo de EA (APP/PS1) y de DM2 (db/db), aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. Los ratones modelo de

EA-DM2 tenían comprometida la memoria espacial y pasaban tiempos significativamente más cortos en el cuadrante donde solía ubicarse la plataforma (cuadrante 2) en comparación con los ratones Control. Sin embargo, después del tratamiento con la LRGT, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo que pasaron en el cuadrante 2 los ratones APP/PS1xdb/db-LRGT y los ratones Control [$F_{(7,68)}$=3.63, ††p=0.002 vs. Control, Control-LRGT y db/db-LRGT], lo que apoya el efecto beneficioso de la LRGT en las alteraciones cognitivas asociadas a la EA y a la DM2 **(Figura 10)**.

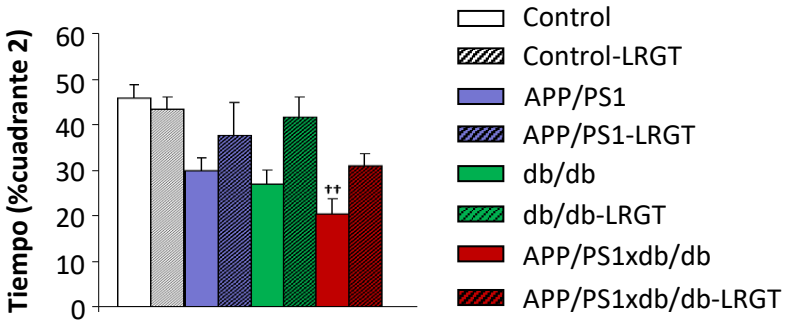


FIGURA 10 || El tratamiento con LRGT mejoró la memoria espacial en animales modelo de EA-DM2. En la fase de retención del MWM observamos que el tratamiento con LRGT también mejoró la memoria de los ratones APP/PS1xdb/db-LRGT (††p=0.002 vs. Control, Control-LRGT y db/db-LRGT)**.** Los datos son representativos de 5 a 12 animales y las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey.

7.2.2 La LRGT mejoró la memoria episódica en la prueba de discriminación de nuevo objeto en los ratones modelo de EA-DM2

La memoria episódica se vio afectada en los ratones APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db en el test de NOD, como se ha descrito anteriormente (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015). Al analizar el paradigma "qué" se observó cierto compromiso en los animales modelo de EA (APP/PS1) y de DM2 (db/db), aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. Sin embargo, en el caso de los animales modelo de EA-DM2 se detectó que empleaban significativamente menos tiempo en explorar los objetos nuevos, mientras que el tratamiento con LRGT suponía una mejora estadísticamente significativa y los animales APP/PS1xdb/db-LRGT tenían un comportamiento similar al de los animales Control [$F_{(7,194)}$=2.76, ††p=0.009 vs. Control, Control-LRGT y APP/PS1-LRGT]. Paralelamente, el paradigma "dónde" también se vio significativamente afectado en los animales modelo de EA-DM2 y el tratamiento con LRGT consiguió revertir esta situación [$F_{(7,202)}$=5.34, **p<0.001 vs. resto de los grupos].

Por otro lado, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio cuando analizamos el paradigma "cuándo" [$F_{(7,214)}$=0.419, p=0.890], indicativo de la especificidad de las alteraciones observadas en la memoria episódica de nuestros animales **(Figura 11)**.

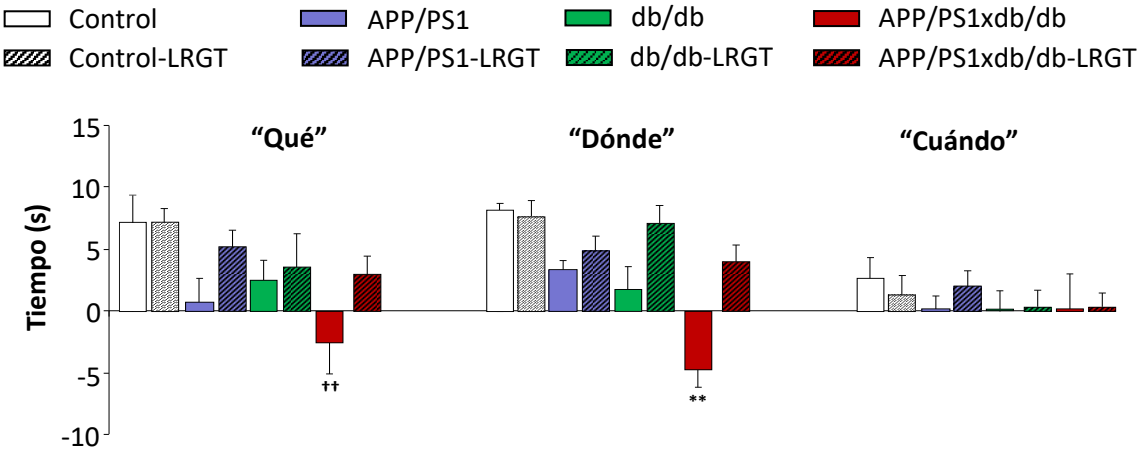


FIGURA 11 || El tratamiento con LRGT mejoró la memoria episódica en ratones modelo de EA-DM2 en la prueba de NOD. El tratamiento con LRGT mejoró significativamente la actuación de los ratones APP/PS1xdb/db en el test NOD para los paradigmas "qué" (††p=0.009 vs. Control, Control-LRGT y APP/PS1-LRGT) y "dónde" (**p<0.001 vs. resto de los grupos). No se observaron diferencias para el paradigma "cuándo" (p=0.890). Los datos son representativos de 5-12 animales y las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey o Tamhane, según se requería.

7.3. EL TRATAMIENTO CON LRGT NO AFECTÓ A LA ACTIVIDAD MOTORA

Cuando se estudió la distancia total recorrida en la prueba de campo abierto para analizar la actividad motora, observamos que los ratones diabéticos (db/db y APP/PS1xdb/db) recorrieron distancias más cortas que los animales no diabéticos [$F_{(6,67)}$=2.1, p=0.046] aunque no se confirmaron las diferencias con las pruebas a posteriori **(Tabla 1)**. La velocidad de natación en el MWM también se utilizó para caracterizar las alteraciones motoras en todos los grupos en estudio. En los ratones modelo de DM2 y de EA-DM2, sin tratamiento o tratados con LRGT, las velocidades de natación fueron significativamente menores a las detectadas en los animales Control y APP/PS1 [$F_{(6,61)}$=9.2, ‡‡p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT] **(Tabla 1)**.

En la prueba de rotarod analizamos el tiempo que los animales conseguían permanecer en el cilindro y comprobamos que los animales modelo de DM2 y de EA-DM2, tratados y sin tratar, pasaban tiempos significativamente menores que los animales Control y

modelo de EA en la prueba [$F_{(6,68)}$=11.73, ‡‡p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT]. Del mismo modo, al analizar la velocidad máxima que alcanzaban los animales en el rotarod, se observó que los animales diabéticos (db/db y APP/PS1xdb/db), sin tratamiento o tratados con LRGT, alcanzaban velocidades significativamente menores que los animales Control y modelo de EA [$F_{(6,67)}$=11.31, ‡‡p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT] **(Tabla 1)**. El hecho de que el tratamiento con LRGT no afectara a los animales diabéticos en la velocidad de natación, tiempo o velocidad máxima en la prueba de rotarod parece indicar que las mejoras que se observaron en los procesos de aprendizaje y memoria, tras el tratamiento con LRGT, no son consecuencia de cambios en la actividad motora sino directamente derivadas de la mejora cognitiva.

TABLA 1 || Evaluación de la actividad motora en ratones tratados con LRGT

	Actividad motora espontánea. Distancia recorrida (cm)	Velocidad de natación (cm/s)	Tiempo en rotarod (s)	Velocidad en rotarod (rpm)
Control	11921.50 ± 378.18	22.09 ± 1.04	15.55 ± 2.42	16.36 ± 2.18
Control-LRGT	11815.75 ± 658.06	19.33 ± 1.27	11.92 ± 2.11	13.25 ± 1.31
APP/PS1	12715.31 ± 707.07	21.28 ± 1.39	18.00 ± 2.74	15.80 ± 1.79
APP/PS1-LRGT	11456.10 ± 548.60	19.83 ± 0.71	14.30 ± 2.03	13.80 ± 1.31
db/db	9446.47 ± 1105.73	14.56 ± 0.88‡‡	2.33 ± 0.88‡‡	6.11 ± 0.80‡‡
db/db-LRGT	9343.74 ± 789.27	13.23 ± 0.59‡‡	2.44 ± 0.84‡‡	5.88 ± 0.63‡‡
APP/PS1xdb/db	9814.83 ± 2189.93	14.07 ± 1.48‡‡	2.67 ± 1.31‡‡	5.50 ± 0.92‡‡
APP/PS1xdb/db-LRGT	9626.63 ± 1344.51	14.48 ± 1.36‡‡	2.00 ± 0.38‡‡	5.75 ± 0.31‡‡

Cuando se compararon las distancias recorridas en campo abierto se observaron diferencias mediante ANOVA de un criterio (p=0.046) que no se confirmaron con las pruebas a posteriori. La velocidad de natación en el MWM se redujo significativamente en ratones diabéticos y no se detectó efecto del tratamiento con LRGT (‡‡p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/ PS1-LRGT). Observamos un perfil similar en la prueba rotarod cuando se analizó el tiempo (‡‡p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT) y velocidad máxima (‡‡p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT) de los animales en la prueba. Los datos son representativos de 5-14 animales y las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey o Tamhane, según se requería.

7.4. LA LRGT REDUJO LA ATROFIA CEREBRAL Y LA PÉRDIDA NEURONAL

7.4.1 La LRGT mantuvo el peso cerebral

Se detectó una atrofia cerebral severa en los ratones modelo de DM2 y de EA-DM2 como se ha descrito previamente (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015) **(Figura 12)**. Al comparar los pesos cerebrales, se observó una reducción estadísticamente significativa en los animales modelo de DM2 y EA-DM2, mientras que el tratamiento con LRGT permitió mantener el tamaño cerebral, que alcanzó niveles de animales Control [$F_{(7,65)}$=6.27, ⊥⊥p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1- LRGT, db/db y APP/PS1xdb/db] **(Figura 12)**.

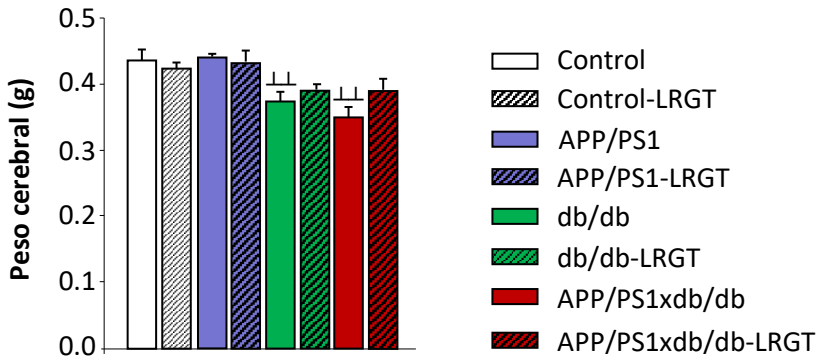


FIGURA 12 || El peso cerebral se mantuvo en los animales modelo de DM2 y de EA-DM2 tratados con la LRGT. Comparamos el peso del cerebro en los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. La reducción de peso cerebral estaba limitada por la LRGT a largo plazo en animales modelo de DM2 y de EA-DM2 (⊥⊥p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db y APP/PS1xdb/db). Los datos son representativos de 4-5 animales y las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey.

7.4.2 El tratamiento con LRGT contribuyó a mantener la integridad cortical sin afectar a otras regiones

La atrofia cerebral se redujo en los ratones diabéticos tras el tratamiento con LRGT. Se observó una reducción del tamaño cortical cuando analizamos los animales modelo de DM2 y este efecto fue más severo en los animales modelo de EA-DM2, como se ha descrito previamente (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015). El tratamiento a largo plazo con LRGT limitó la pérdida cortical en los animales modelo de DM2 y de EA-DM2, que alcanzaron valores Control cuando comparamos el tamaño de la corteza [$F_{(7,186)}$=6.49, ‡‡p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT; ††p<0.01 vs. Control, Control- LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT] **(Figuras 13 y 14)**.

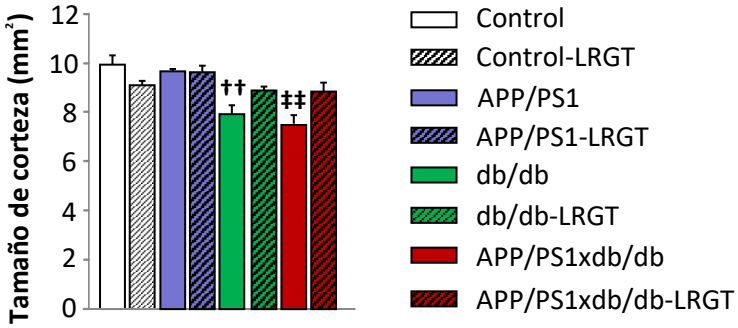


FIGURA 13 || El tamaño cortical mejoró en los animales modelo de DM2 y de EA-DM2 tratados con la LRGT. Analizamos el tamaño de la corteza en los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. El tamaño cortical mejoró significativamente con el tratamiento de la LRGT (‡‡p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT; ††p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 y APP/PS1-LRGT). Los datos son representativos de 4-5 animales y las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey.

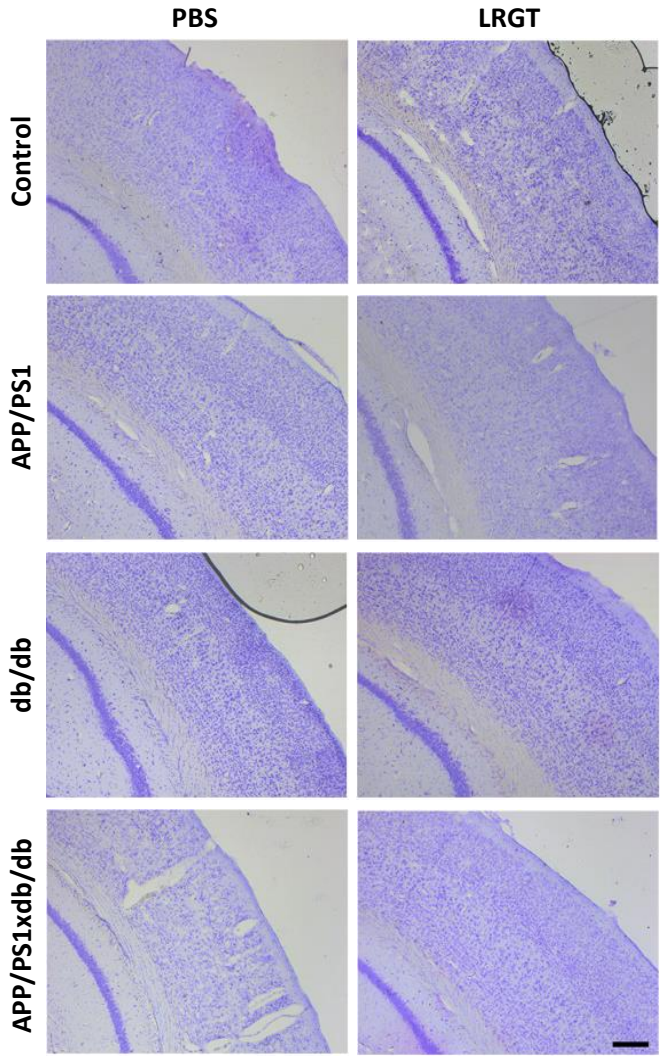


FIGURA 14 || El tamaño cortical se mantuvo en los animales modelo de DM2 y EA-DM2 con el tratamiento con LRGT. Ejemplo ilustrativo de tinción con cresil violeta que muestra un grosor cortical reducido en ratones db/db y APP/PS1xdb/db al compararlos con los ratones Control y APP/PS1, así como con los animales diabéticos tratados con LRGT. Se muestra cómo la LRGT limita la disminución del tamaño cortical. Barra de escala=200µm.

El área de las hemisecciones cerebrales disminuyó ligeramente en los animales modelo de DM2 (db/db) y de EA-DM2 (APP/PS1xdb/db), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Tras el tratamiento con LRGT el tamaño de las hemisecciones se aproximó a los niveles Control, aunque no se confirmaron las diferencias con las pruebas a posteriori [$F_{(7,185)}$=2.52, p=0.017] **(Figura 15)**.

El tamaño del hipocampo disminuyó ligeramente en los animales modelo de DM2 (db/db) y EA-DM2 (APP/PS1xdb/db) y el tratamiento con LRGT aumentó ligeramente el tamaño; sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas [$F_{(7,95)}$=0.16, p=0.498] **(Figura 15)**.

El ensanchamiento ventricular también permite valorar la atrofia cerebral. Se observó un ligero aumento del tamaño ventricular en los animales modelo de DM2 y de EA que se redujo tras el tratamiento con LRGT, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas cuando comparamos todos los grupos en estudio [$F_{(7,119)}$=0.843, p=0.554] **(Figura 15)**.

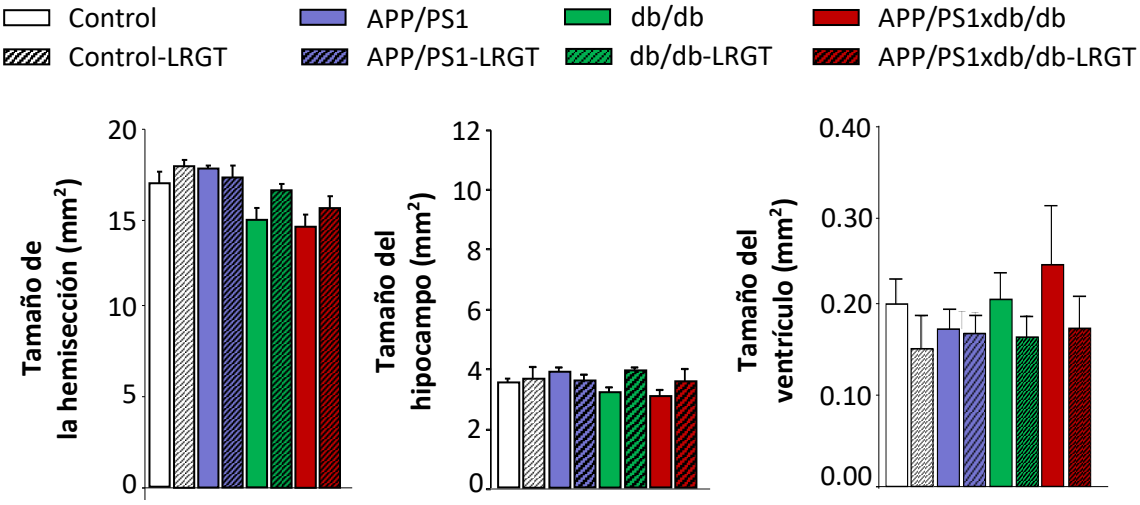


FIGURA 15 || El tratamiento con LRGT no tuvo efectos sobre los tamaños de la hemisección, del hipocampo o del ventrículo de los animales en estudio. Se analizaron el tamaño de la hemisección, el hipocampo y el ventrículo en los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db, no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. Los tamaños de la hemisección (p=0.017) aumentaron ligeramente tras el tratamiento con LRGT, pero no se confirmaron las diferencias con las pruebas a posteriori. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño del hipocampo (p=0.498) y del ventrículo (p=0.554). Los datos son representativos de 4-5 animales.

7.4.3 La densidad neuronal se mantuvo tras el tratamiento con LRGT

Con el fin de profundizar en la caracterización de la atrofia cerebral observada, también se analizó la densidad neuronal en la corteza. Se observó una reducción estadísticamente significativa de la población neuronal en la proximidad de las placas amiloides en los ratones modelo de EA-DM2 al compararlos con los animales modelo de EA. Sin embargo, el tratamiento con LRGT limitó la reducción de la densidad neuronal cerca de placas de los animales modelo de EA-DM2 [$F_{(3,417)}$=4.02, ††p=0.008 vs. APP/PS1 y APP/PS1-LRGT] **(Figuras 16 y 17)**.

Los animales modelo de EA y de DM2 mostraron una disminución de la ratio NeuN/DAPI en áreas libres de placas amiloides al compararlos con los animales Control, señal de cierto compromiso de la población neuronal. Este efecto fue más severo en el modelo mixto de EA-DM2, indicativo del efecto sinérgico de ambas patologías. El tratamiento con LRGT contribuyó a mejorar la densidad neuronal en los animales modelo de EA y de DM2, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística al compararlos con estos modelos no tratados. En el caso del modelo mixto, el tratamiento con LRGT supuso una mejora de la densidad neuronal cortical en las zonas alejadas de placas, apoyando el efecto neuroprotector de la LRGT [$F_{(3,4440)}$=49.57, ‡‡p<0.001 vs. Control, Control-LRGT,APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT, APP/PS1xdb/db-LRGT; ##p<0.01 vs. Control y Control-LRGT] **(Figuras 16 y 17)**.

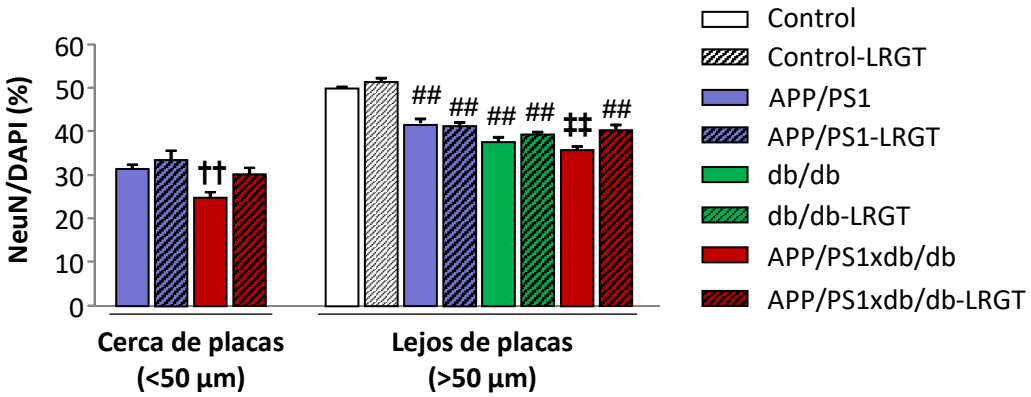


FIGURA 16 || El tratamiento con LRGT mantuvo la densidad neuronal en los ratones modelo de EA-DM2. Se analizó la ratio NeuN/DAPI en los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. La ratio NeuN/DAPI se redujo en la proximidad de placas amiloides en ratones APP/PS1xdb/db y la LRGT mejoró esta situación (††p=0.008 vs. APP/PS1 y APP/PS1-LRGT). Un perfil similar se observó en áreas corticales sin placas amiloides (‡‡p<0.001 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT; ##p<0.01 vs. Control y Control-LRGT). Los datos son representativos de 5 animales (531-731 ROI/grupo). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey o Tamhane, según se requería.

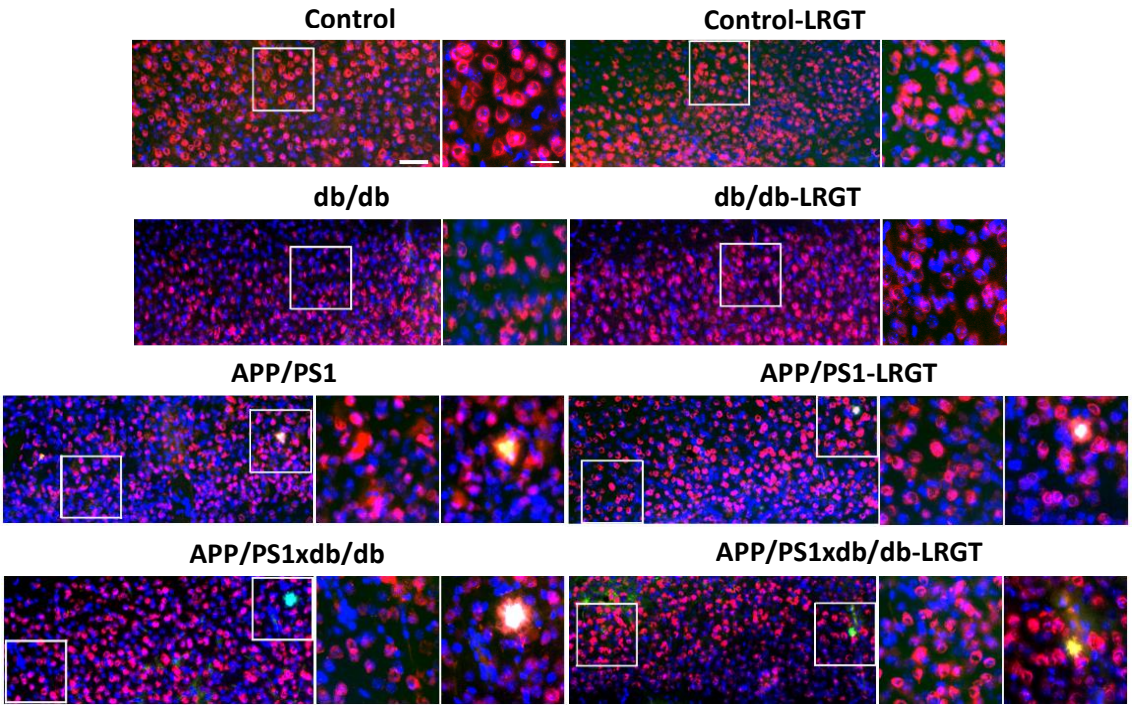


FIGURA 17 || La densidad neuronal en la corteza se mantuvo con el tratamiento de LRGT en los animales modelo de EA-DM2. Imagen ilustrativa de tinción NeuN (neuronas, rojo) y DAPI (núcleos celulares, azul) en áreas corticales ubicadas en la proximidad de placas amiloides (tinción TS, verde) y en áreas sin placas amiloides. Las imágenes ampliadas de regiones representativas están marcadas con cuadrados blancos y se presentan junto a la imagen original. Se observa en las imágenes cómo en los animales modelo de EA-DM2 tratados con LRGT mejoró la densidad neuronal. Barra de escala=50 µm. Barra de escala en imágenes aumentadas=25µm.

En los animales APP/PS1 el depósito de placas amiloides comienza en torno a los 4 meses de edad con afectación preferente de la corteza (Garcia-Alloza y col. 2006b, Jankowsky y col. 2004). Por otro lado, trabajos previos de nuestro grupo muestran que el depósito de placas amiloides es menor en los animales de la colonia mixta (APP/PS1dxdb/db) (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015) y a los 6 meses de edad, cuando se llevaron a cabo nuestros estudios *postmortem*, la densidad de placas amiloides es muy limitada en el hipocampo, por lo que no fue posible determinar el efecto de la presencia de las placas sobre la densidad neuronal hipocámpica de nuestros animales.

En áreas alejadas de las placas amiloides, la densidad neuronal estaba significativamente reducida en el hipocampo de los animales modelo de DM2 al compararlos con los grupos Control. La ratio NeuN/DAPI se vio disminuida en los ratones modelo de EA-DM2 no tratados con respecto al resto de grupos en estudio. Sin embargo, el tratamiento con LRGT revirtió significativamente esta situación para el modelo mixto [$F_{(3,843)}$=15.71,

++p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db y db/db-LRGT; ##p<0.01 vs. Control y Control-LRGT] **(Figura 18).**

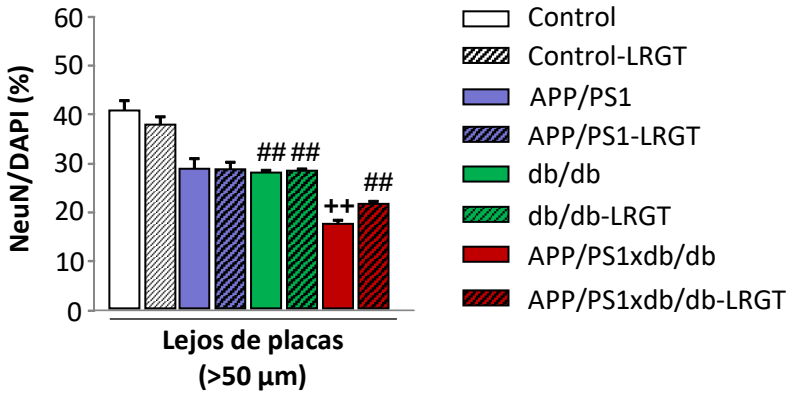


FIGURA 18 || La densidad neuronal mejoró en el hipocampo de los ratones modelo de EA-DM2 con el tratamiento de LRGT. Se analizó la densidad NeuN/DAPI en los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. La densidad neuronal se redujo lejos de placas amiloides en ratones APP/PS1xdb/db y la LRGT mejoró esta situación (##p<0.01 vs. Control y Control-LRGT; ++p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db y db/db-LRGT). Los datos son representativos de 5 animales (60-200 ROI/grupo). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba de Tamhane.

7.5. LA CURVATURA NEURONAL SE REDUJO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LRGT

La curvatura neuronal es un marcador de disfunción neuronal (Garcia-Alloza y col. 2006a, Infante-Garcia y col. 2017b) que se observó aumentado en la proximidad de las placas amiloides en los animales modelo de EA-DM2 no tratados cuando los comparamos con los animales modelo de EA. El tratamiento con LRGT revirtió esta situación para el modelo mixto [$F_{(3,2084)}$=4.46, **p=0.004 vs. resto de grupos] **(Figuras 19 y 20)**.

En áreas libres de placas se detectó un aumento de la curvatura neuronal en los animales modelo de EA y de DM2 al compararlos con los animales Control. El aumento de la curvatura neurítica fue más severo en el modelo mixto, lo que apoya el efecto sinérgico de ambas patologías cuando ocurren concomitantemente, como se ha descrito previamente (Garcia-Alloza y col. 2006a, Infante-Garcia y col. 2017b). El tratamiento con LRGT redujo ligeramente la curvatura neuronal en los animales modelo de DM2 (db/db-LRGT) y observamos una mejora estadísticamente significativa en los animales modelo de EA-DM2 tratados con LRGT (APP/PS1xdb/db-LRGT) [$F_{(7,3498)}$=13.13, **p<0.01 vs. resto de grupos, ##p<0.01 vs. Control y Control-LRGT, ǂǂp<0.01 vs. Control] **(Figuras 19 y 20)**.

Tras analizar la curvatura neuronal cerca y lejos de placas amiloides en los animales tratados con LRGT observamos como ésta se redujo significativamente en el modelo mixto, reforzando el papel neuroprotector de este tratamiento.

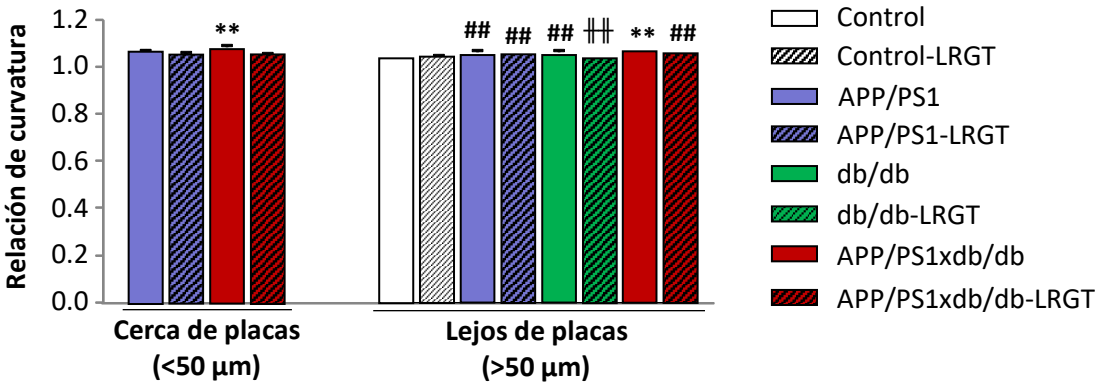


FIGURA 19 || La curvatura se redujo cerca y lejos de placas amiloides tras el tratamiento con LRGT en los animales modelo de EA-DM2. Se analizó la curvatura axonal en los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db, no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. La LRGT redujo la curvatura neuronal en la proximidad de las placas (**p=0.004 vs. resto de grupos) y en áreas libres de placas amiloides (**p<0.01 vs. resto de grupos, ##p<0.01 vs. Control y Control-LRGT, ╪╪<0.01 vs Control). Los datos son representativos de 5 animales por grupo (308- 920 neuronas/grupo). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey o Tamhane, según se requería.

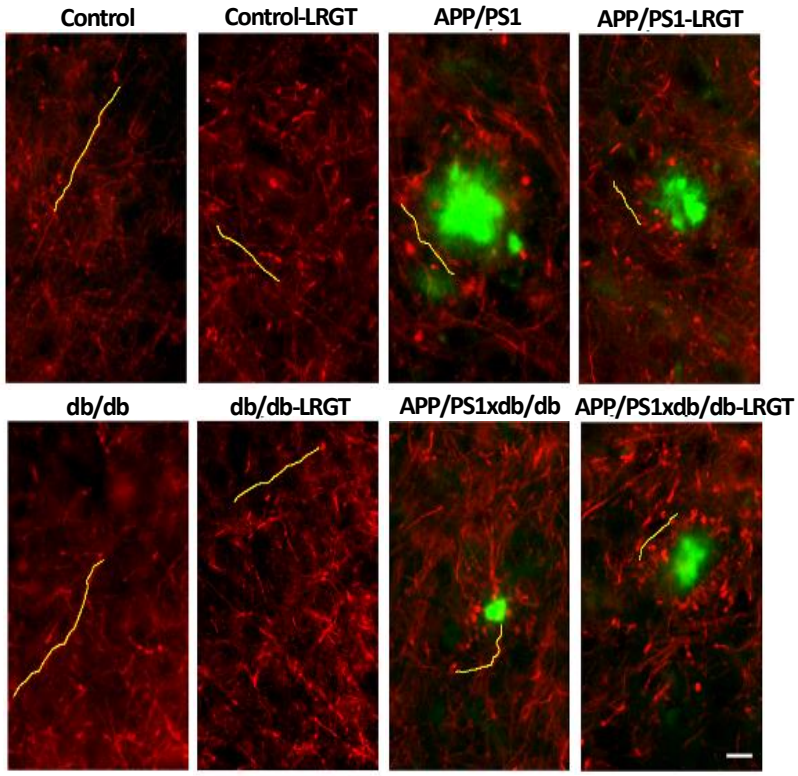


FIGURA 20 || La curvatura neuronal cerca y lejos de placas amiloides se redujo tras el tratamiento con LRGT en los animales modelo de EA-DM2. Imágenes ilustrativas de tinción smi312 (neuritas, rojo; las líneas amarillas marcan neuritas representativas) y TS (placas amiloides, verde) en las proximidades y lejos de las placas de amiloide. Se observó como el tratamiento con LRGT redujo la curvatura en los animales APP/PS1xdb/db–LRGT cerca y lejos de placas amiloides. Barra de escala=10 µm.

7.6. LA LRGT REDUJO LA PATOLOGÍA AMILOIDE

7.6.1 La carga y el tamaño de las placas amiloides disminuyó tras el tratamiento con LRGT en ratones con EA

Tras la tinción con TS se observó que la carga de placas amiloides en la corteza fue significativamente mayor en los ratones modelo de EA no tratados que en los animales modelo de EA-DM2 (APP/PS1xdb/db) no tratados. Tras el tratamiento con LRGT detectamos una reducción de la carga amiloide cortical en los animales modelo de EA, mientras que no se observaron diferencias en los animales modelo de EA-DM2 (APP/PS1xdb/db) tratados con LRGT (TS [$F_{(3,109)}$=10.025, **p<0.01 vs. resto de grupos]) **(Figura 21)**. Con la tinción 4G8 se observó un perfil similar en la corteza. La carga de placas amiloides en los animales modelo de EA fue significativamente mayor que en los animales del modelo mixto. Tras el tratamiento con LRGT se redujo la carga de placas en los animales modelo de EA (APP/PS1) mientras que no se observaron diferencias significativas en los animales APP/PS1xdb/db tratados (4G8 [$F_{(3,107)}$=5.60, ††p<0.001 vs. APP/PS1xdb/db y APP/PS1xdb/db-LRGT]) **(Figura 21)**.

También se analizó el tamaño de las placas amiloides en la corteza cerebral mediante tinción con TS. Se observó que el tratamiento con LRGT redujo el tamaño de las placas al comparar los grupos modelo de EA (APP/PS1) y de EA-DM2 (APP/PS1xdb/db) no tratados con los animales tratados [$F_{(3,1246)}$=16.59, ‡‡p<0.01 vs. APP/PS1-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT, ŦŦp<0,001 vs. APP/PS1-LRGT] **(Figura 22)**. Del mismo modo, tras la tinción con 4G8 se observó que el tamaño de las placas era significativamente mayor en los animales modelo de EA (APP/PS1) que en el modelo mixto (APP/PS1xdb/db), en línea con observaciones previas (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015). Aunque no se observaron diferencias significativas entre los animales modelo de EA-DM2 tratados y no tratados, el tratamiento con LRGT redujo significativamente el tamaño de las placas en los animales modelo de EA [$F_{(3,2024)}$=17.34, **p<0.01 vs. resto de grupos, ##p<0.001 APP/PS1xdb/db-LRGT] **(Figura 22)**.

Dado que la TS únicamente marca núcleo denso y que la inmunotinción con 4G8 además es capaz de marcar el halo de la placa amiloide, de modo general las placas marcadas con 4G8 son más grandes que las marcadas con TS. Ambos marcadores mostraton un perfil similar, con placas densas y halos mayores en los animales modelo de EA cuando se compararon con los animales modelo de EA-DM2 **(Figura 23)** (Infante-Garcia y col. 2016).

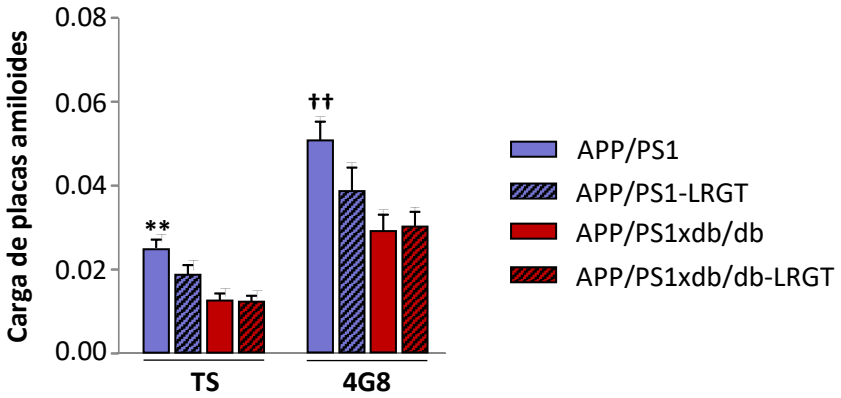


FIGURA 21 || La LRGT disminuyó la carga de placas amiloides en los animales modelo de EA. La carga de las placas amiloides se cuantificó mediante la tinción con TS y la inmunotinción con 4G8 en los animales APP/PS1 y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. El tratamiento con LRGT redujo la carga de placas amiloides en la corteza de ratones APP/PS1 (TS: **p<0.01 vs. resto de grupos); (4G8: ††p<0.001 vs. APP/PS1xdb/db y APP/PS1xdb/db-LRGT). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey o Tamhane, según se requería.

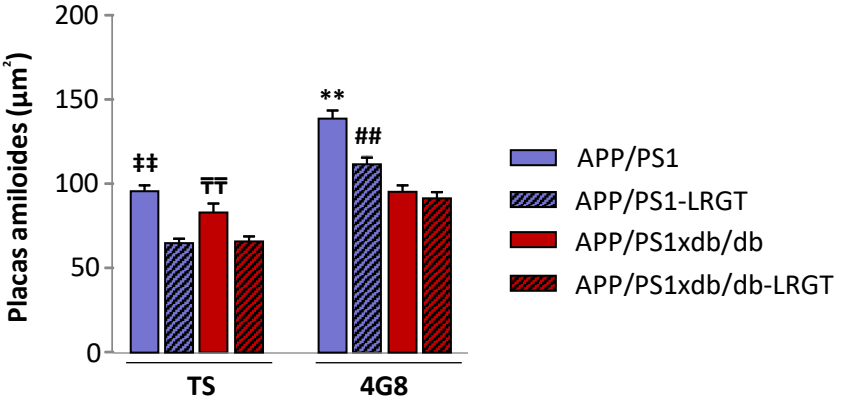


FIGURA 22 || La LRGT disminuyó el tamaño de placas amiloides en la corteza de los animales modelo de EA y de EA-DM2. El tamaño de las placas amiloides se cuantificó mediante la tinción con TS y la inmunotinción con 4G8 en los animales APP/PS1 y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. El tratamiento con LRGT redujo el tamaño de las placas amiloides en la corteza de los ratones APP/PS1xdb/db (TS: ‡‡p<0.01 vs. APP/PS1-LRGT y APP/PS1xdb/db LRGT, T̄T̄p<0.001 vs. APP/PS1-LRGT); (4G8: **p<0.01 vs. resto de grupos, ##p<0.001 vs. APP/PS1xdb/db-LRGT). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey o Tamhane, según se requería.

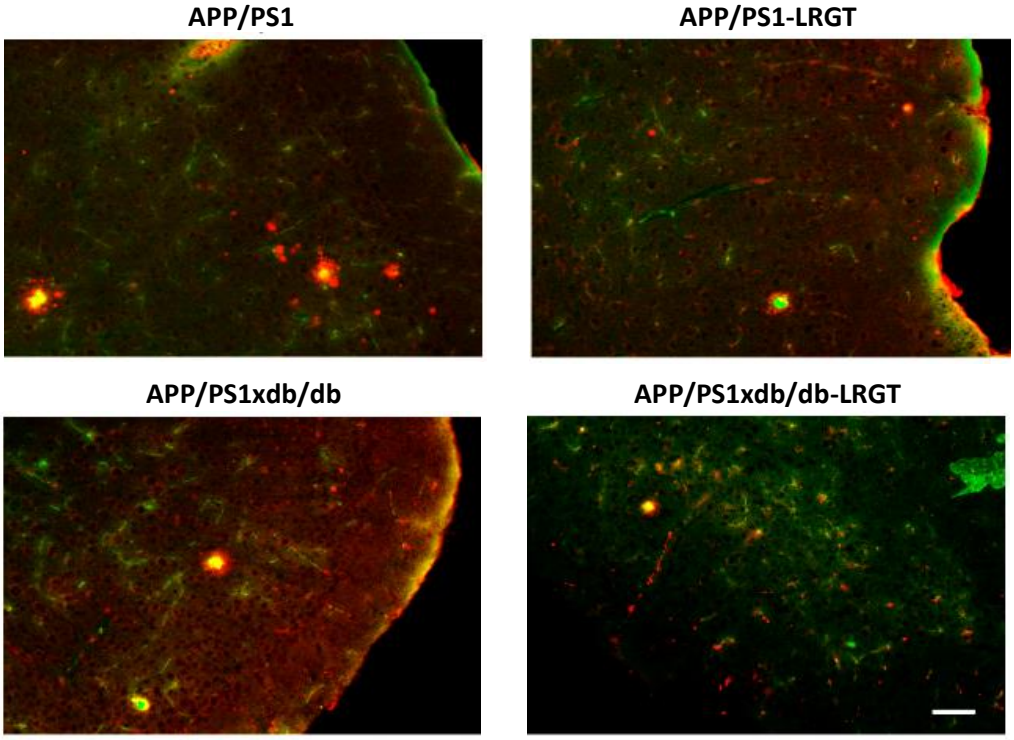


FIGURA 23 || El tratamiento con LRGT disminuyó la carga y el tamaño de placas amiloides en la corteza de ratones modelo de EA. Imagen ilustrativa de la tinción TS (placas amiloides, verde) y 4G8 (placas amiloides, rojo) en la corteza. Se muestra la disminución de la carga y el tamaño de placas amiloides en los animales modelo de EA tratados con LRGT. Barra de escala=50µm.

Al analizar la carga de placas marcadas con TS en el hipocampo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio (modelo de EA y de EA-DM2 tratados y no tratados), aunque los animales modelo de EA (APP/PS1) presentaron un ligero incremento, no significativo, de la carga de placas amiloides (TS [$F_{(3,54)}$=1.21, p=0.312]) **(Figura 24)**. En los ratones modelo de EA la carga de placas amiloides, marcadas con 4G8, era ligeramente superior a la carga en los ratones modelo de EA-DM2, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. El tratamiento con LRGT no tuvo efecto en ninguno de los modelos de EA (APP/PS1 y APP/PS1xdb/db) (4G8 [$F_{(3,55)}$=1.33, p=0.273]) **(Figura 24)**.

También se analizó el tamaño de placas amiloides en el hipocampo, que siguió un patrón similar al observado en la corteza, aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Tras la tinción con TS se detectó una ligera reducción del tamaño de las placas amiloides en los animales modelo de EA y de EA-DM2 tratados con LRGT, al compararlos con los grupos no tratados, pero las diferencias no fueron

estadísticamente significativas (TS [$F_{(3,190)}$=2.44, p=0.065]) **(Figura 25)**. Tras la inmunotinción con 4G8, se observó un incremento no significativo del tamaño de placas amiloides en los animales modelo de EA con respecto a los animales modelo de EA-DM2 no tratados. El tratamiento con LRGT disminuyó ligeramente el tamaño de placas amiloides en los animales modelo de EA, aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas. En los animales modelo de EA-DM2 tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados y no tratados (4G8 [$F_{(3,314)}$=2.75, p=0.043]) **(Figura 25)**.

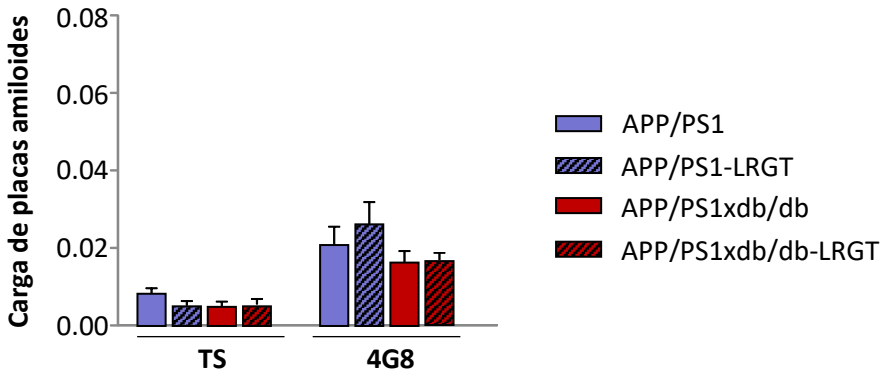


FIGURA 24 || La LRGT no afectó a la carga de placas amiloides en hipocampo en los animales modelo de EA y de EA-DM2. La carga de las placas amiloides se cuantificó en el hipocampo mediante tinción con TS e inmunotinción con 4G8 en los animales APP/PS1 y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la carga de placas amiloides en los grupos en estudio (TS:p=0.312; 4G8:p=0.273).

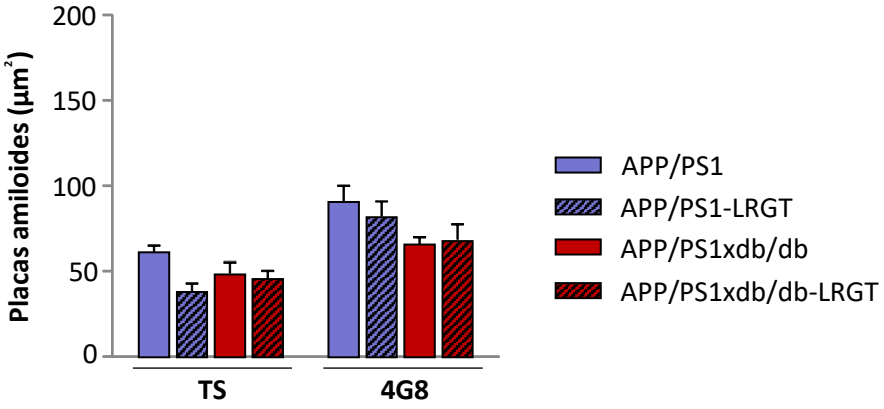


FIGURA 25 || La LRGT no afectó al tamaño de placas amiloides en hipocampo en los animales modelo de EA y de EA-DM2. El tamaño de las placas amiloides se cuantificó en el hipocampo mediante tinción con TS e inmunotinción con 4G8 en los animales APP/PS1 y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de placas amiloides en los grupos en estudio (TS:p=0.065; 4G8:p=0.043).

7.6.2 La LRGT no tuvo efecto sobre la densidad vasos penetrantes corticales con CAA

Al analizar el número de vasos penetrantes con CAA por mm^2 en la corteza, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre animales modelo de EA y de EA-DM2, ni tampoco entre los animales tratados y no tratados [$F_{(3,105)}$=0.160, p=0.923] **(Figura 26)**. No obstante, se observó una ligera disminución de la densidad de vasos penetrantes con CAA por mm^2 al comparar los ratones APP/PS1xdb/db-LGRT con los animales APP/PS1xdb/db sin tratamiento.

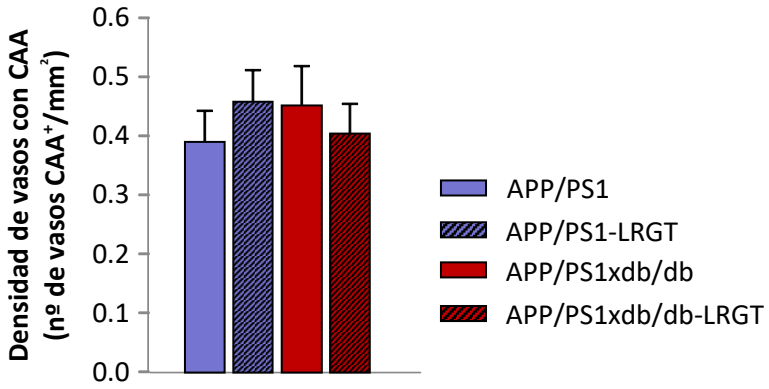


FIGURA 26 || El número de vasos penetrantes corticales CAA^+/mm^2 fue similar en todos los grupos de estudio. No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando cuantificamos la cantidad de CAA en vasos penetrantes en la corteza (p=0.923).

7.6.3 El tratamiento con LRGT no afectó a los niveles de βA40 o βA42 pero redujo los niveles de βA oligomérico en la corteza de los ratones modelo de EA-DM2

Cuando se analizaron los niveles de βA40 y βA42 solubles en la corteza no observamos diferencias estadísticamente significativas al comparar los ratones modelo de EA y de EA-DM2 tratados y no tratados con LRGT (βA40 soluble [$F_{(3,25)}$=0.908, p=0.451] y βA42 soluble [$F_{(3,26)}$=1.162, p=0.343]) **(Figura 27)**.

Los niveles de βA40 insolubles corticales resultaron significativamente menores en los animales del modelo mixto (APP/PS1xdb/db) cuando los comparamos con los animales modelo de EA (APP/PS1) tal y como se ha descrito previamente (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015). Aunque se observó cierta tendencia de la LRGT a disminuir los niveles de βA40 insolubles, las diferencias no alcanzaron significación estadística [$F_{(3,26)}$=3.62, ‡p=0.026 vs. APP/PS1] **(Figura 27)**.

Un perfil similar se observó al comparar los niveles de βA42 insoluble en la corteza. De acuerdo a estudios previos (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015) detectamos niveles significativamente menores en los animales APP/PS1xdb/db al compararlos con los animales APP/PS1. Aunque el tratamiento con LRGT redujo ligeramente los niveles de βA42 insoluble en ambos grupos, sólo se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas para los animales del modelo mixto [$F_{(3,24)}$=4.56, ‡p=0.011 vs. APP/PS1] **(Figura 27)**.

Paralelamente se valoraron los niveles de βA oligomérico cortical y se observó un ligero aumento de los niveles de los animales del modelo mixto (APP/PS1xdb/db) al compararlos con los animales modelo de EA (APP/PS1), aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. Tras el tratamiento con LRGT se observó una reducción de los niveles de βA oligoméricos corticales en los animales APP/PS1 que alcanzaron diferencias significativas en los animales APP/PS1xdb/db tras el tratamiento [$F_{(3,24)}$=0.310, †p=0.046 vs. APP/PS1xdb/db] **(Figura 27)**.

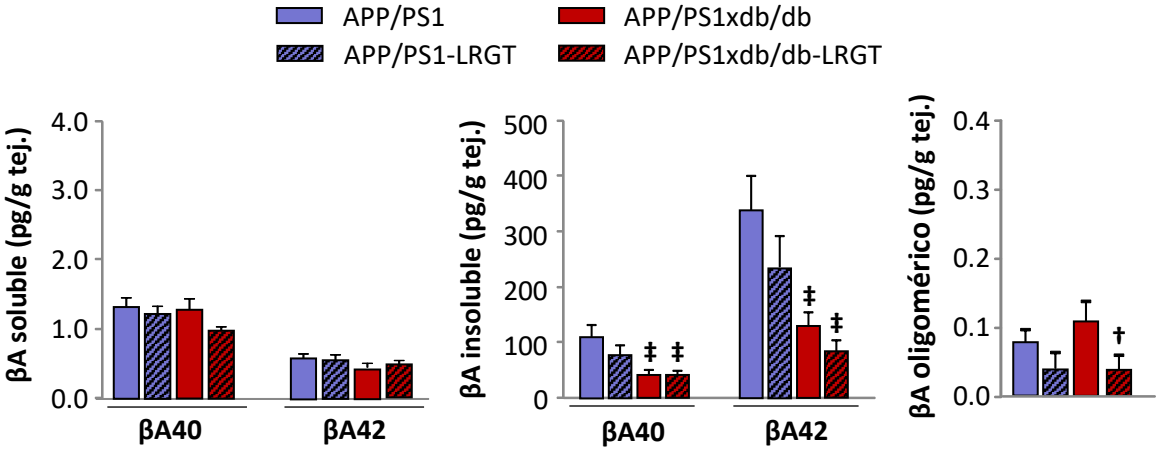


FIGURA 27 || Los niveles de βA oligomérico en la corteza disminuyeron tras el tratamiento con LRGT en los animales modelo de EA-DM2. Los niveles de βA40, βA42 y βA oligomérico se determinaron en los animales APP/PS1 y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. No se observaron diferencias significativas cuando se analizaron los niveles de βA40 soluble (p=0.451) o βA42 soluble (p=0.343) en la corteza. Los niveles de βA40 insoluble (‡p=0.026 vs. APP/PS1) y βA42 insoluble (‡p=0.011 vs. APP/PS1) fueron menores en los animales APP/PS1xdb/db en comparación con los animales APP/PS1. El tratamiento con LRGT redujo significativamente los niveles de βA oligomérico en la corteza de los animales APP/PS1xdb/db-LRGT (†p=0.046 vs. APP/PS1xdb/db). Los datos son representativos de 6-9 animales. Las diferencias se detectaron mediante ANOVA un criterio seguida de la prueba b de Tukey o Tamhane, según se requería.

En el hipocampo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas cuando se compararon los niveles de βA40 soluble [$F_{(3.26)}$=0.828, p=0.490] entre los grupos en estudio **(Figura 28)**. Los niveles de βA42 soluble no se vieron afectados en el hipocampo cuando se compararon los animales modelo de EA y modelo de EA-DM2 tratados y no tratados [$F_{(3,24)}$=0.373, p=0.733] **(Figura 28)**. Tampoco se observaron diferencias cuando comparamos los niveles de βA insoluble (βA40 insoluble [$F_{(3,25)}$=0.743, p=0.537]; βA42 insoluble [$F_{(3,27)}$=0.207, p=0.891]) **(Figura 28)**.

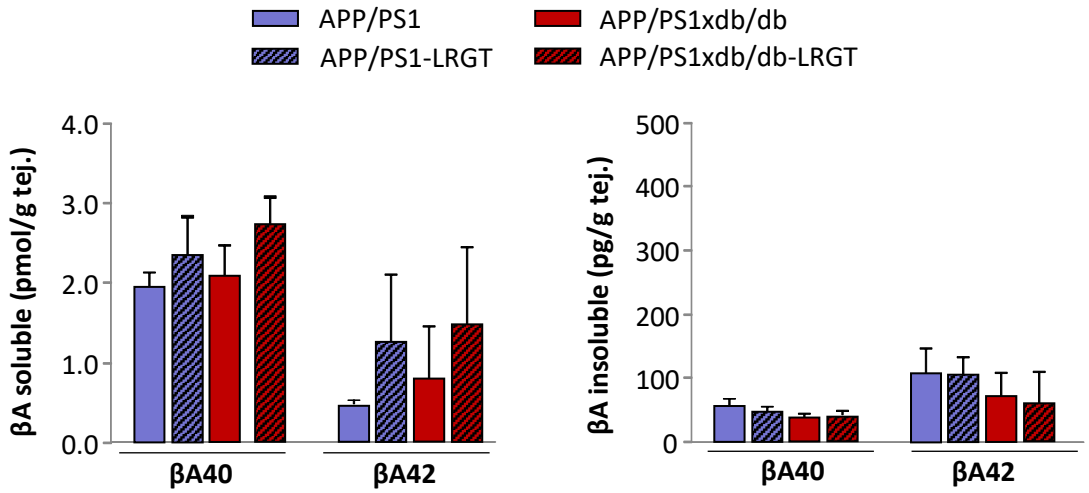


FIGURA 28 || Los niveles de βA40 y βA42 no se modificaron tras el tratamiento con LRGT en el hipocampo en los ratones modelo de EA y de EA-DM2. Los niveles de βA40 y βA42 se determinaron en animales APP/PS1 y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (βA40 soluble: p=0.490; βA42 soluble: p=0.733; βA40 insoluble: p=0.537; βA42 insoluble: p=0.891). Los datos son representativos de 6-9 animales.

7.7. EL TRATAMIENTO CON LRGT REDUJO LA PATOLOGÍA TAU

Se observó un aumento en la fosforilación de la proteína tau cortical en los animales db/db, aunque las diferencias sólo alcanzaron significación estadística cuando los ratones APP/PS1xdb/db no tratados se compararon con los animales Control [$F_{(7,72)}$=2.97, ††p=0.009 vs. Control]. La LRGT redujo la relación fosfo-tau/tau total en los ratones modelo de EA-DM2 en la corteza, alcanzando los valores Control **(Figuras 29 y 30)**.

También se detectó un ligero incremento no significativo en la fosforilación de tau en el hipocampo de los ratones modelo de DM2 y de EA-DM2. Si bien el tratamiento con LRGT redujo ligeramente la fosforilación de la proteína tau, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas [$F_{(7,34)}$=0.768, p=0.618] **(Figura 29)**.

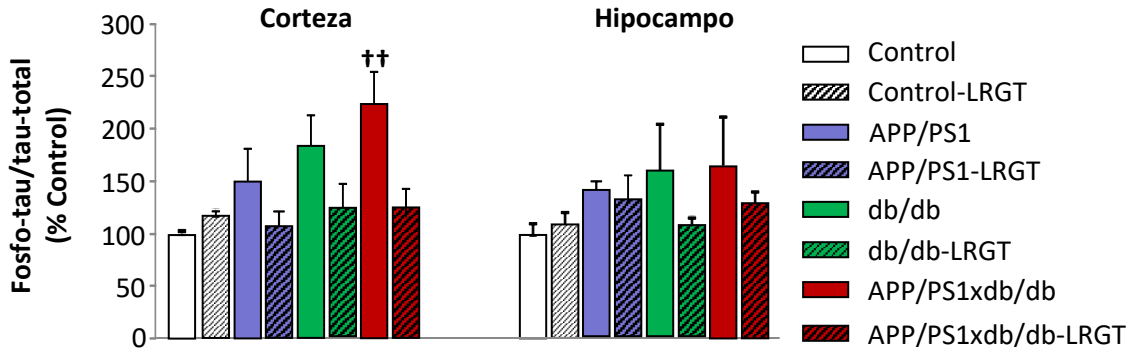


FIGURA 29 || El tratamiento con LRGT redujo la fosforilación de la proteína tau en los ratones modelo de EA-DM2. Se analizaron los ratios fosfo-tau/tau total en animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. La fosforilación de tau se redujo en la corteza después del tratamiento con LRGT (††p=0.009 vs Control). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey. No se observaron diferencias estadísticamente significativas cucando se compararon los ratios para fosfo-tau/tau total en el hipocampo (p=0.618). Los datos son representativos de 3-11 ratones.

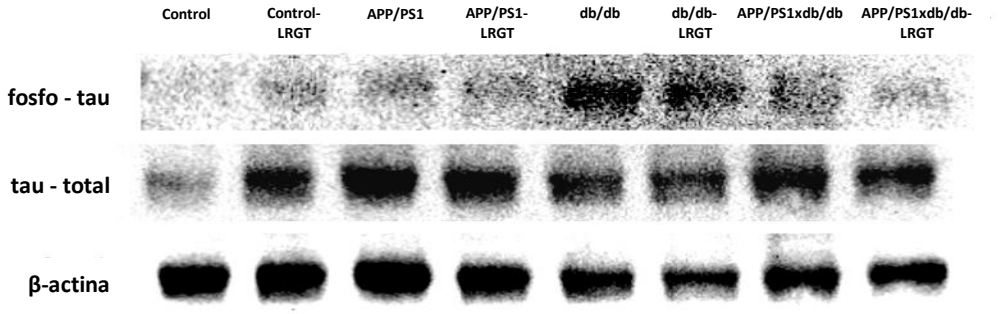


FIGURA 30 || El tratamiento con LRGT redujo la fosforilación tau en la corteza en ratones modelo de EA-DM2. Imagen representativa de western blot para fosfo-tau, tau total y β-actina en la corteza de todos los grupos estudiados, en la que observa un aumento de la ratio fosfo-tau/tau total en el modelo mixto con respecto al Control. Así mismo, se aprecia una reducción de la fosforilación de tau en los animales modelo de EA-DM2 tratados con la LRGT.

7.8. LA LRGT REDUJO LAS HEMORRAGIAS CORTICALES ESPONTÁNEAS EN RATONES MODELO DE EA-DM2

En los animales modelo de DM2 se observó un aumento de la carga hemorrágica cortical (% área cubierta por hemorragias), aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas al compararlos con los demás grupos. Sin embargo, se detectó un aumento estadísticamente significativo de la carga de hemorragias en nuestro modelo mixto (APP/PS1xdb/db). El tratamiento con LRGT redujo este daño de pequeño vaso en los animales modelo de EA-DM2 tratados con LRGT, que mostraron una carga hemorrágica cortical similar a la de los grupos Control [$F_{(7,156)}$=2.57, †p=0.012 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT] **(Figura 31)**.

La densidad de hemorragias cortical (número de hemorragias/mm^2) también fue mayor en los ratones modelo de DM2. Al igual que ocurrió con la carga de hemorragias cortical, este incremento fue estadísticamente significativo para el modelo mixto cuando se compararon con los animales Control y APP/PS1 [$F_{(7,159)}$=5.25, ††p<0.001 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT] **(Figuras 32 y 33)**.

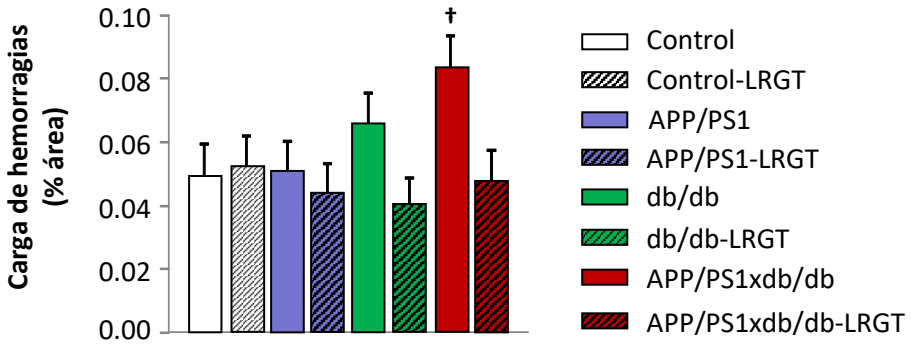


FIGURA 31 || El tratamiento con LRGT redujo la carga de hemorragias corticales en animales modelo de EA-DM2. Se cuantificó la carga hemorrágica mediante tinción con azul de Prusia en la corteza de los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. El tratamiento con LRGT redujo la carga de hemorragias en la corteza (†p=0.012 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT). Los datos son representativos de 3-5 ratones (489-1012 ROI/grupo). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba de b de Tukey.

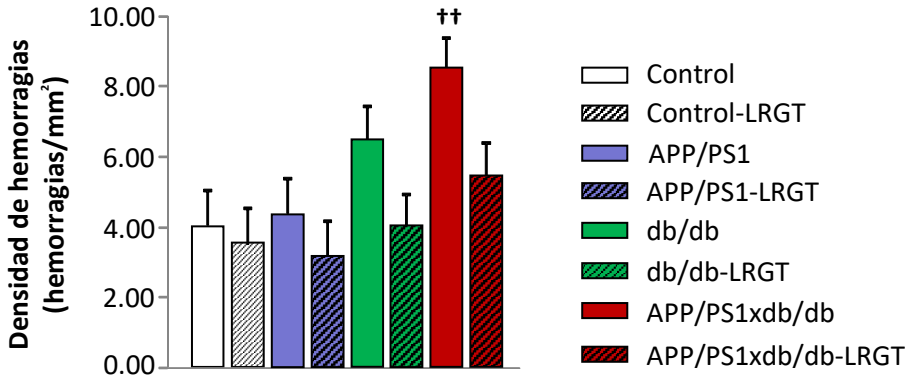


FIGURA 32 || El tratamiento con LRGT redujo la densidad de hemorragias corticales en los animales modelo de EA-DM2. Se cuantificó la densidad hemorrágica mediante tinción con azul de Prusia en la corteza de los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. El tratamiento con LRGT redujo la densidad de hemorragias cortical (††p<0.001 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, db/db-LRGT y APP/PS1xdb/db-LRGT). Los datos son representativos de 3-5 ratones (489-1012 ROI/grupo). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba Tamhane.

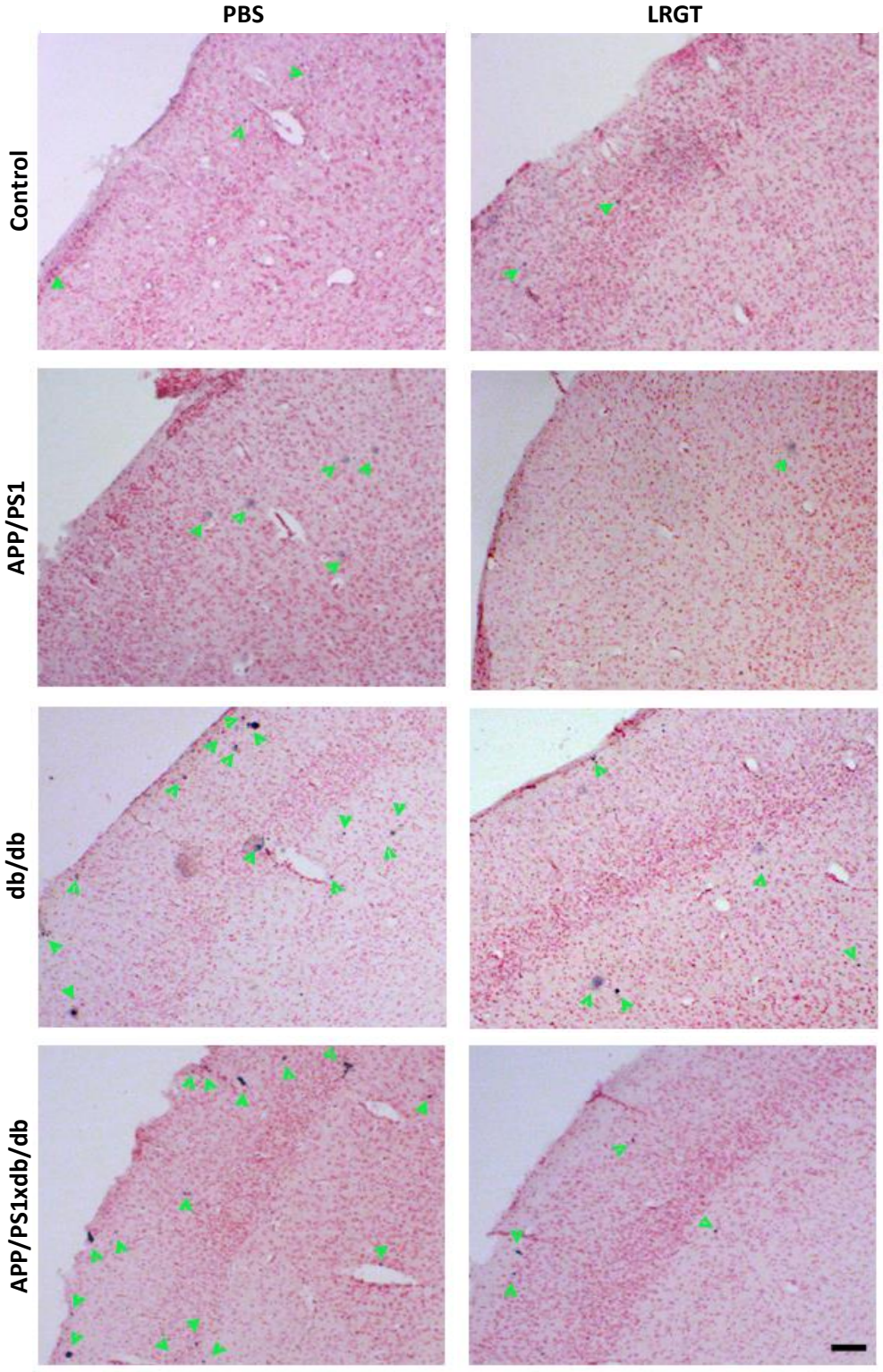


FIGURA 33 || El sangrado espontáneo cortical fue menor después del tratamiento con LRGT en los animales modelo de EA-DM2. Ejemplo ilustrativo de hemorragias corticales teñidas con tinción azul de Prusia (depósitos de hierro, azul). Las flechas verdes apuntan a hemorragias individuales. Observamos como el tratamiento con LRGT redujo significativamente la carga y densidad de hemorragias. Barra de escala=100µm.

Por otro lado, en el hipocampo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio cuando se analizó la carga de hemorragias [$F_{(7,80)}$=0.403, p=0.898] **(Figura 34)** y la densidad de hemorragias [$F_{(7,82)}$=1.78, p=0.101] **(Figura 35).**

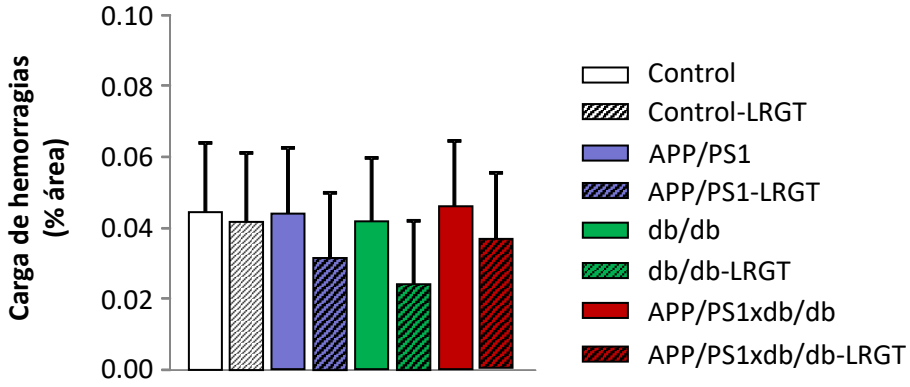


FIGURA 34 || El tratamiento de LRGT no tuvo efecto en la carga de hemorragias en el hipocampo. Se cuantificó la carga hemorrágica mediante tinción con azul de Prusia en el hipocampo de los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT**.** No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el hipocampo cuando se analizó la carga de hemorragias (p=0.898). Los datos son representativos de 3-5 ratones (489-1012 ROI/grupo).

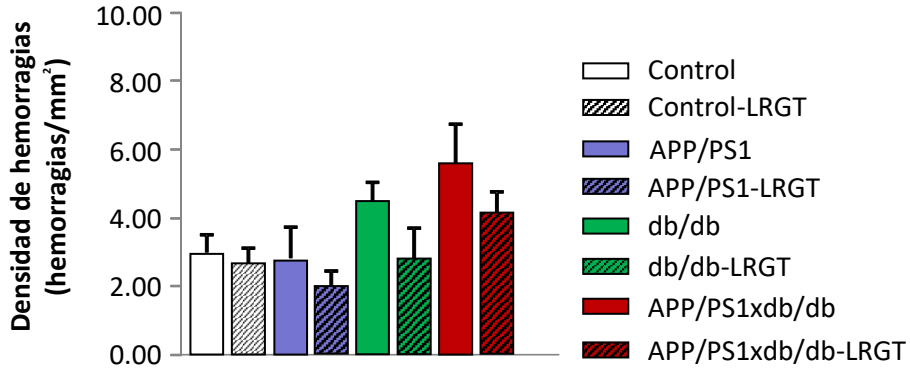


FIGURA 35 || El tratamiento de LRGT no tuvo efecto en la densidad de hemorragias en el hipocampo. Se cuantificó la densidad hemorrágica mediante tinción con azul de Prusia en el hipocampo de los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. No se detectaron diferencias en el hipocampo cuando se analizó la densidad de hemorragias (p=0.101). Los datos son representativos de 3-5 ratones (489-1012 ROI/grupo).

7.9. LA LRGT REDUJO LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA EN RATONES MODELO DE EA-DM2

En línea con observaciones previas (Hierro-Bujalance y col. 2020b, Infante-Garcia y col. 2016), al analizar la carga de microglía cortical próxima a placas amiloides en los animales modelo de EA-DM2, se detectó que ésta estaba significativamente disminuida con respecto a los ratones modelo de EA [$F_{(3,527)}$=15.36, ‡‡p<0.01 vs. APP/PS1] **(Figuras 36 y 37)**, probablemente debido a la menor carga y tamaño de las placas amiloides.

El tratamiento con LRGT redujo significativamente la carga de microglía cortical en la proximidad de placas amiloides en ratones modelo de EA y de EA-DM2 [$F_{(3,527)}$=15.36, **p<0.01 vs. resto de los grupos, ‡‡p<0.01 vs. APP/PS1] **(Figuras 36 y 37)**.

Cuando se estudió carga de microglía de la corteza en regiones libres de placas amiloides, se observó que en los animales modelo de EA y de DM2 no tratados estaba significativamente aumentada con respecto a los animales Control. Al analizar los ratones modelos de EA-DM2 no tratados se observó un aumento significativo de la activación microglial con respecto al resto de grupos en estudio [$F_{(7,4735)}$=81.81, **p<0.01 vs. resto de los grupos, ‡‡p<0.01 vs. Control y Control-LRGT] **(Figuras 36 y 37)**. Al estudiar el efecto de la LRGT en la carga de microglía cortical lejos de placas amiloides se observó una disminución de la activación microglial estadísticamente significativa en los ratones modelo de DM2, y diferencias estadísticamente significativas más robustas en animales modelo de EA-DM2 después del tratamiento con LRGT [$F_{(7,4735)}$=81.81, **p<0.01 vs. resto de los grupos, ††p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db y db/db-LRGT, ŦŦp<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT y db/db, ‡‡p<0.01 vs. Control y Control-LRGT] **(Figuras 36 y 37)**.

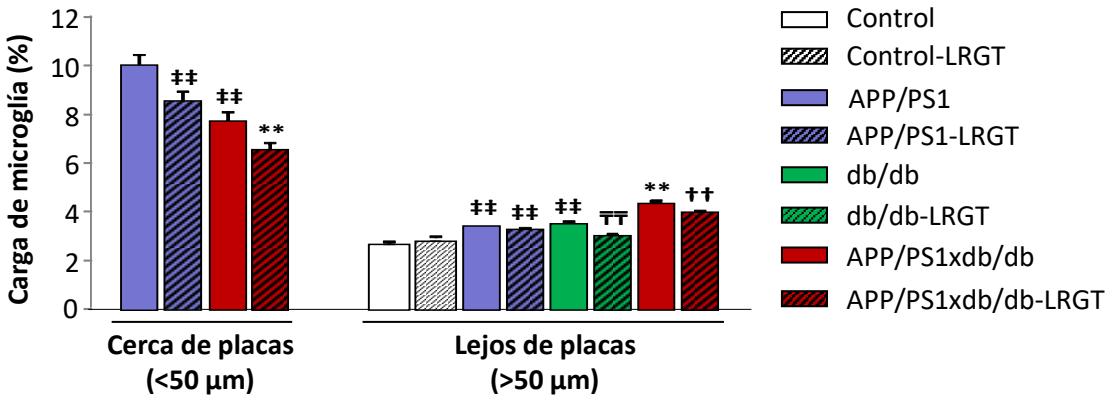


FIGURA 36 || La carga microglial se redujo en la corteza después del tratamiento con LRGT en ratones modelo de EA, de DM2 y de EA-DM2. La carga de microglía se cuantificó con inmunotinción para Iba-1 cerca (<50µm) de las placas amiloides en animales APP/PS1 y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT y lejos (>50µm) de las placas amiloides en animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. El tratamiento con LRGT redujo la carga de microglía cortical cerca de las placas amiloides en ratones APP/PS1 y APP/PS1xdb/db (**p<0.01 vs. resto de grupos, ‡‡p<0.01 vs. APP/PS1). La LRGT también disminuyó la carga de microglía en áreas corticales libres de placas amiloides en ratones diabéticos (**p<0.01 vs. resto de los grupos, ††p<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db y db/db-LRGT, ŦŦp<0.01 vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT y db/db, ‡‡p<0.01 vs. Control y Control-LRGT). Los datos son representativos de 5 ratones (572- 748 ROI/grupo). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de un criterio seguida de la prueba b de Tukey o Tamhane, según se requería.

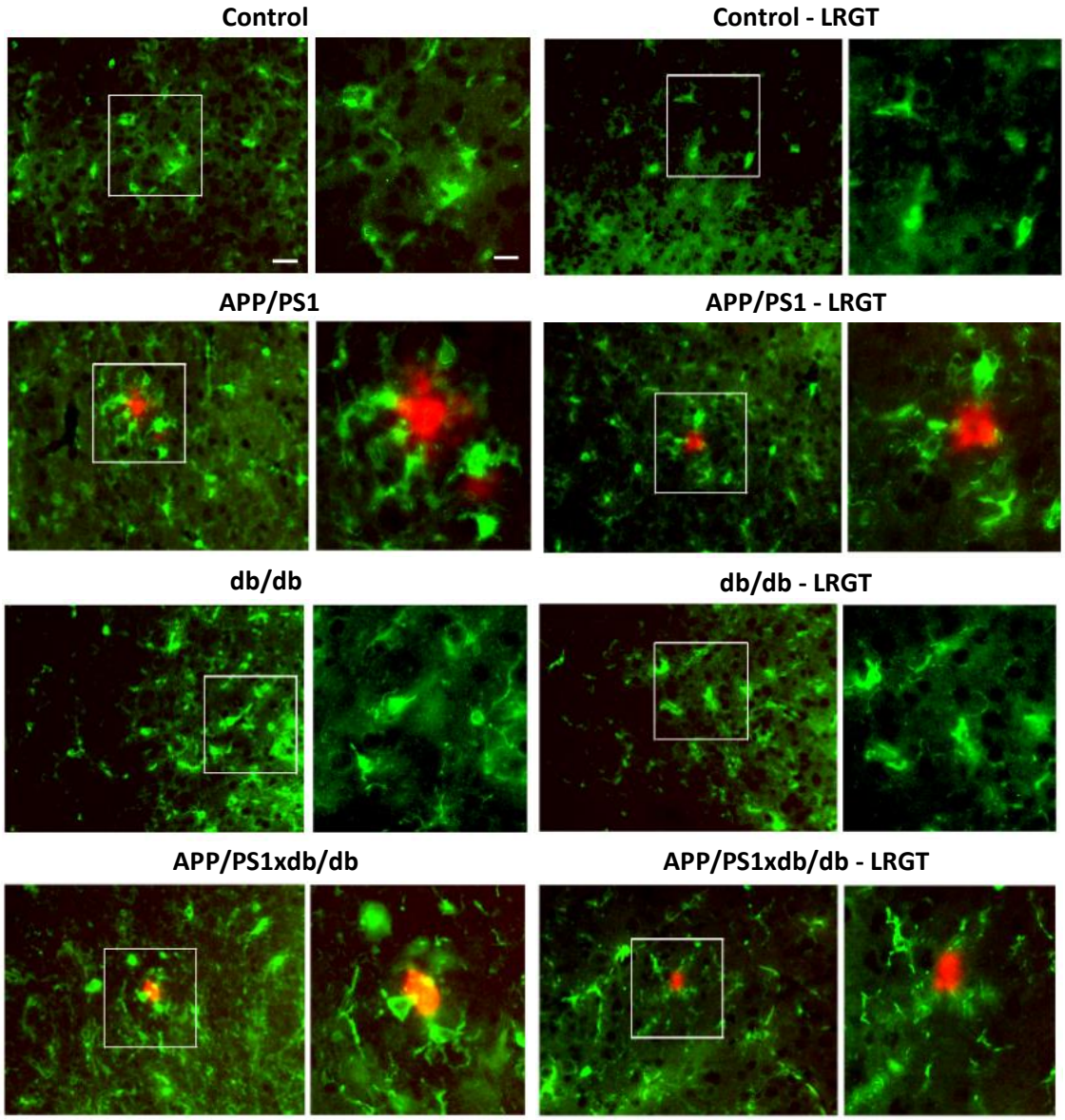


FIGURA 37 || La carga de microglía cortical se redujo después del tratamiento con LRGT. Ejemplo ilustrativo de inmunotinción cortical para Iba-1 (microglía, verde) y 4G8 (placas de amiloide, rojo). Se puede observar una disminución en la carga de microglía cerca de placas amiloides en animales APP/PS1 y APP/PS1xdb/db tratados con LRGT y lejos de placas en animales modelo de EA, de DM2 y de EA-DM2 tras el tratamiento con LRGT. Las imágenes ampliadas de regiones representativas están marcadas con cuadrados blancos y se presentan junto a la imagen original. Barra de escala=50 µm. Barra de escala en las imágenes ampliadas=10 µm.

Cuando se analizó la carga de microglía cerca de placas amiloides en el hipocampo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio [$F_{(3,30)}$=1.47, p=0.242]. Del mismo modo, cuando se analizaron regiones lejos de placas amiloides tampoco se observaron diferencias [$F_{(7,880)}$=1.14, p=0.335] **(Figura 38)**.

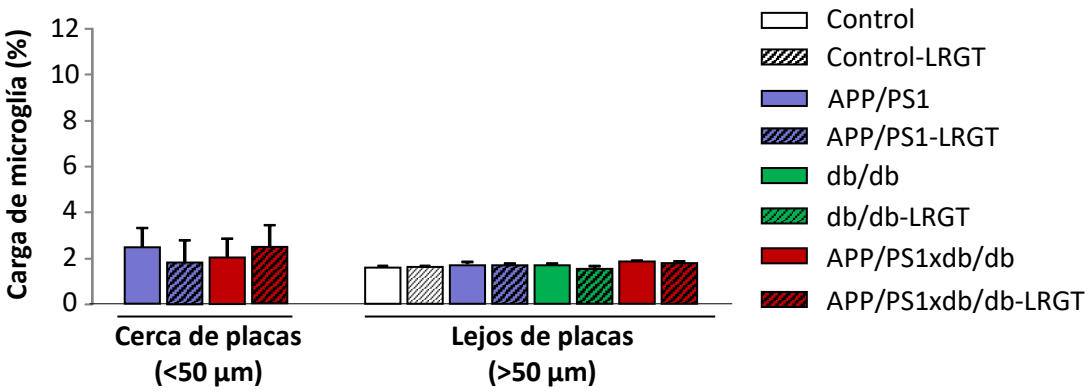


FIGURA 38 || El tratamiento con la LRGT no afectó a la carga microglial en el hipocampo. La carga de microglía se cuantificó con inmunotinción Iba-1 cerca (<50µm) de las placas amiloides en animales APP/PS1 y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT y lejos (>50µm) de las placas amiloides en los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la carga microglial en el hipocampo cerca (p=0.242) o lejos (p=0.335) de las placas amiloides. Los datos son representativos de 5 ratones.

7.10. La LRGT no tuvo efecto sobre la expresión de ARNm de IR-A, IR-B o IGF-1R

Cuando se analizó la expresión del ARNm de IR-A, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la corteza de ninguno de los grupos en estudio [$F_{(7,51)}$=0.948, p=0.479] **(Figura 39).** Se detectaron resultados similares para IR-B [$F_{(7,49)}$=0.504, p=0.827] o IGF-1R [$F_{(7,49)}$=0.735, p=0.644] **(Figura 39).**

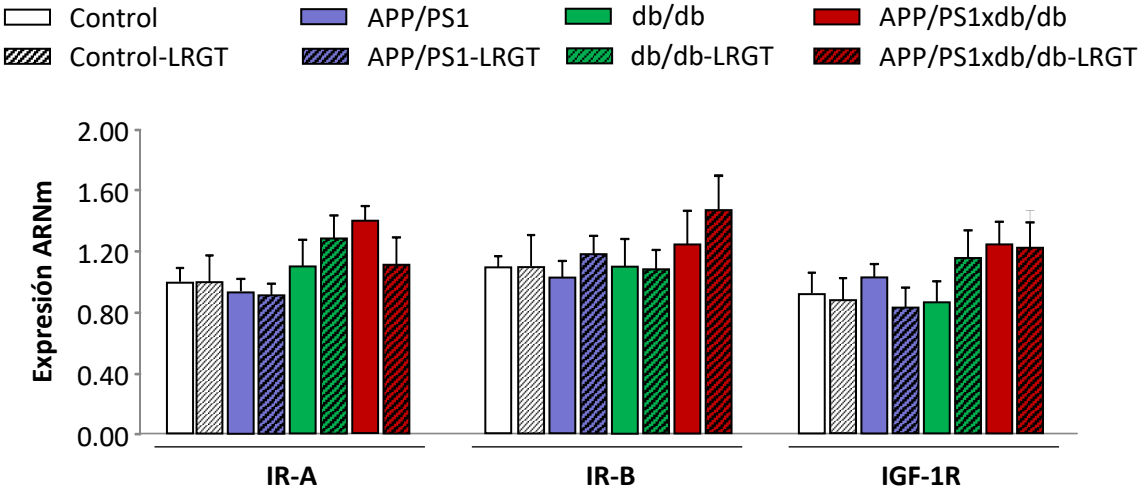


FIGURA 39 || El tratamiento con LRGT no tuvo efecto sobre la expresión del ARNm de IR-A, IR-B e IGF-1R. La expresión de ARNm de IR-A, IR-B e IGF-1R se determinó en la corteza en los animales Control, APP/PS1, db/db y APP/PS1xdb/db no tratados y tratados durante 20 semanas con LRGT. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los marcadores: IR-A (p=0.479), IR-B (p=0.827) o IGF-1R (p=0.644). Los datos son representativos de 6-9 ratones.

VIII. DISCUSIÓN

La EA es el tipo de demencia más común y supone entre un 60 y un 70% de todos los casos (Alzheimer_Europe 2020, Garre-Olmo 2018). Aunque la edad es el principal factor de riesgo para sufrir Alzheimer, los desórdenes metabólicos, y en concreto la DM2, también tienen un papel relevante como factores de riesgo (Crous-Bou y col. 2017, Cummings y col. 2022, Ikram y col. 2020). Desde el estudio Rotterdam se puso de manifiesto la relación entre la EA y la DM2, y que los pacientes con DM2 tenían un aumento del riesgo relativo de padecer EA de 1.4 (Ott y col. 1996, Ott y col. 1999), datos que han sido respaldados por trabajos posteriores (Luchsinger y col. 2004, Ravipati y col. 2022).

La EA es una patología compleja y actualmente no tiene tratamiento exitoso (Arvanitakis y col. 2019). Además de los tratamientos clásicos sintomáticos, como fármacos anticolinesterásicos (Birks y Harvey 2018, Tariot y col. 2000, Winblad y col. 2007) y memantina (Jiang y Jiang 2015), recientemente se ha aprobado en EEUU aducanumab (Biogen_Inc.ADUHELM™ 2021, US_Food_&_Drug_Administration 2021), un anticuerpo monoclonal dirigido a la reducción del βA cerebral (Sevigny y col. 2016). Sin embargo, sus efectos son limitados y la Agencia Europea del Medicamento no ha aprobado su uso en Europa dados los datos disponibles hasta la fecha (Dal-Ré 2022, European_Medicines_Agency 2021). En general, los resultados del tratamiento con aducanumab son todavía controvertidos (Knopman y col. 2021), lo que probablemente también ha contribuido a que su ámbito de aplicación actual no sea más amplio. Por tanto, los pacientes con EA siguen teniendo una gran necesidad de contar con opciones terapéuticas.

La estrecha relación entre la EA y la DM2 se sustenta entre otros en que la duración de la diabetes se ha asociado a una disminución del volumen del hipocampo (Samaras y col. 2020). Del mismo modo las alteraciones vasculares (Bello-Chavolla y col. 2019), de la señalización de insulina (Hobday y Parmar 2021, Ryu y col. 2019) o del aclaramiento del amiloide cerebral (Sun y col. 2020) también han permitido relacionar la patología tipo Alzheimer y las alteraciones metabólicas. Estos datos apoyan el estudio de fármacos antidiabéticos que limiten o frenen la patología cerebral de la EA y el deterioro cognitivo en modelos animales (Hierro-Bujalance y col. 2020b, Infante-Garcia y col. 2018) y en pacientes (Burns y col. 2021, Cao y col. 2018a, Craft y col. 2020, Koenig y col. 2017,

Luchsinger y col. 2016, Reger y col. 2006). En este sentido, los análogos del GLP-1 reducen las patologías amiloide y tau, la inflamación y el deterioro cognitivo en diferentes modelos (Batista y col. 2018, Chen y col. 2017c, Duarte y col. 2020, Hölscher 2022, Jantrapirom y col. 2020, McClean y col. 2011). Asimismo, estudios en pacientes muestran que la LRGT podría tener un papel neuroprotector en personas con riesgo de padecer EA (Watson y col. 2019). Además, el ensayo ELAD actualmente está evaluando el efecto de la LRGT en pacientes con EA (Femminella y col. 2019). Sin embargo, hasta donde sabemos, ningún estudio ha analizado el papel de LRGT en modelos complejos que presentan tanto EA como DM2, como se ve regularmente en el ámbito clínico. Es por ello que hemos estudiado los efectos del tratamiento a largo plazo con LRGT en ratones APP/PS1xdb/db, un modelo murino mixto que reproduce las complicaciones cerebrales asociadas a la EA y a la DM2, incluyendo la atrofia cerebral, la patología neuronal y tau, las alteraciones en el procesamiento de amiloide, el daño vascular y el proceso inflamatorio (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2017b).

8.1. Efecto del tratamiento con LRGT en las alteraciones metabólicas

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestros experimentos, el tratamiento con LRGT ayuda a mantener el peso corporal. Aunque estudios previos en ratones 3xTg revelan que el tratamiento con LRGT no tiene efecto en el peso corporal de los animales tratados (Chen y col. 2013), nuestros resultados están en línea con trabajos anteriores que muestran que los tratamientos antidiabéticos pueden reducir la pérdida de peso corporal en ratones diabéticos caquécticos (Hierro-Bujalance y col. 2020a, Infante-Garcia y col. 2018, Sugizaki y col. 2017). Del mismo modo, también observamos que el tratamiento con LRGT favorece el mantenimiento de los niveles de insulina partir de las 10 semanas de edad en nuestros ratones diabéticos. Estudios anteriores también han mostrado que el tratamiento con LRGT ayuda a preservar los niveles de insulina plasmáticos en otros modelos de trastornos metabólicos (Millar y col. 2017) y que este proceso parece estar mediado por un aumento de la autofagia y la proliferación β-pancreática (Fan y col. 2018), que contribuyen a mantener la hiperinsulinemia y el control glucémico inducido por LRGT, tal y como se ha detectado con otros análogos de GLP-1 (Park y col. 2015). Paralelamente, el mantenimiento de la actividad β-pancreática inducida por LRGT permite controlar la hiperglucemia propia de los animales diabéticos,

tal y como se ha observado en otros estudios con LRGT en modelos animales (Elseady y col. 2021, Kapodistria y col. 2018) y en pacientes (Kim y col. 2021). En este sentido, el tratamiento con análogos de GLP-1, además de disminuir la hiperglucemia reduce la resistencia periférica a la insulina (Arnold y col. 2018).

8.2. EFECTO DE LA LRGT EN LA ATROFIA CEREBRAL

La atrofia cerebral es una característica clásica de la EA (Lane y col. 2018, Marino y col. 2019, Sengoku 2020) pero también los pacientes con DM2 padecen atrofia cortical y subcortical (Biessels y Despa 2018, Callisaya y col. 2019, Moran y col. 2019), mostrando entre otras, reducciones significativas en el volumen del diencéfalo, del sistema límbico y de diferentes estructuras subcorticales (Chen y col. 2017b, Moran y col. 2013, Zhang y col. 2022). La atrofia cerebral en la DM2 se ha relacionado con la resistencia a la insulina a nivel cerebral (Biessels y Despa 2018, Jacka y col. 2015) y algunos trabajos han sugerido que este proceso puede estar mediado por los receptores de insulina cerebrales, especialmente del hipotálamo, el cuerpo estriado, el cerebelo, el hipocampo, y las regiones corticales (Kullmann y col. 2020), muy relacionadas con los procesos de aprendizaje y memoria.

Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado que el peso cerebral está disminuido en animales db/db y de un modo más severo, en animales de la colonia mixta (APP/PS1xdb/db) (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015), indicativo de atrofia cerebral. Del mismo modo, el tamaño de las hemisecciones cerebrales también está comprometido, observándose una atrofia cortical especialmente severa en animales APP/PS1xdb/db cuando ambas patologías han cronificado, mientras que la afectación del hipocampo parece más limitada y más tardía en nuestro modelo (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015).

La evaluación *postmortem* de los animales en nuestros experimentos ha revelado que la atrofia cerebral en animales diabéticos se redujo significativamente tras el tratamiento con LRGT, que contribuyó al mantenimiento del peso cerebral y del tamaño cortical en los ratones db/db y APP/PS1xdb/db. En concordancia con nuestros resultados, otros estudios han mostrado que diferentes tratamientos antidiabéticos pueden limitar la atrofia cerebral en modelos animales que reproducen la patología tipo

Alzheimer (Li y col. 2020, Robinson y col. 2019). En concreto, en este modelo mixto de EA-DM2, el ratón APP/PS1xdb/db, también se ha observado cómo tras la administración a largo plazo de polipíldora antidiabética (que contiene metformina, aspirina, simvastatina y un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina) y de inhibidores del cotransportador sodio-glucosa 2 como la empaglifozina, se limita la atrofia cortical y se mantiene la densidad neuronal y el peso cerebral (Hierro-Bujalance y col. 2020b, Infante-Garcia y col. 2018). Trabajos con otros fármacos antidiabéticos como la linangliptina (inhibidor de dipeptidilpeptidasa-4) también muestran una reducción de la atrofia cerebral provocada por una isquemia cerebral. La linangliptina limita la disminución del volumen cerebral y del número de neuronas en la corteza y el hipocampo de animales diabéticos (Ma y col. 2015b). Incluso estudios en pacientes diabéticos evidencian que la atrofia cerebral de estos pacientes puede estar determinada por su habilidad para administrarse insulina (Sato y col. 2011). Además, aunque la resistencia insulínica se asocia al deterioro cognitivo, en pacientes con EA temprana se ha observado que elevados niveles de insulina se relacionan con una menor atrofia hipocámpica y cortical (Burns y col. 2012). Otros trabajos en pacientes con isquemia cerebral también muestran que el tratamiento con LRGT supone un incremento significativo de la tasa de supervivencia celular. Por otro lado, el fármaco restauró los niveles NeuN y GAP-43 en las neuronas corticales, manteniendo un tamaño cortical próximo al detectado en pacientes sanos, lo que apoya la capacidad de la LRGT para reparar en daño cerebral tras una lesión de estas características (He y col. 2020).

8.3. Papel de la LRGT en la patología neuronal

Los receptores del GLP-1 se expresan principalmente en las células β-pancreáticas y en el sistema gastrointestinal, aunque también se encuentran en el cerebro (Farr y col. 2016, Hamilton y Hölscher 2009). Entre otras funciones, el GLP-1 es un factor de crecimiento y también aumenta la proliferación celular (Buteau 2008, Müller y col. 2019). Del mismo modo, los análogos de GLP-1 inducen la proliferación y la diferenciación celular y estimulan el crecimiento de las neuritas (Salcedo y col. 2012). Siguiendo esta idea, estudios específicamente centrados en la LRGT también muestran su capacidad para aumentar la proliferación en la región subgranular del hipocampo (Parthsarathy y Holscher 2013) así como su capacidad neurorregenerativa al aumentar

la neurogénesis hipocámpica (McClean y Hölscher 2014a, Parthsarathy y Holscher 2013) y en la zona subventricular (Salles y col. 2018, Salles y col. 2020).

Paralelamente, otros trabajos también han mostrado que la activación de receptores de GLP-1 cerebrales reduce el daño neuronal y la apoptosis en el hipocampo (During y col. 2003). De manera similar, el papel neuroprotector de la LRGT se ha evaluado en modelos animales de EA en los que se observa su capacidad para prevenir la pérdida sináptica y el deterioro de la plasticidad sináptica (Batista y col. 2018, McClean y col. 2011), lo que podría respaldar el uso de la LRGT en pacientes con demencia tipo Alzheimer (Femminella y Edison 2014). En nuestras manos, al valorar la densidad neuronal, mediante la relación NeuN/DAPI, observamos que la LRGT ayuda a mantener la población de neuronas a largo plazo, tanto en la proximidad como lejos de placas amiloides. En este sentido, estudios previos muestran la capacidad de la LRGT para reducir la pérdida neuronal y mantener el crecimiento neurítico tras insultos oxidativos (He y col. 2018, He y col. 2020). Del mismo modo, en modelos animales de diabetes el tratamiento con LRGT protege las neuronas hipocámpicas al promover la autofagia mediada por la vía AMPK/mTOR (Kong y col. 2018, Palleria y col. 2017). La capacidad neuroprotectora de la LRGT también se ha comprobado en modelos de EA en los que se ha observado una reducción del proceso neurodegenerativo mediado por JNK y ERK (Chen y col. 2017c). Igualmente, el tratamiento crónico con LRGT permite preservar la densidad sináptica en la corteza e hipocampo de animales modelo de EA (McClean y Hölscher 2014a) y de marcadores presinápticos como sinaptofisina (Holubová y col. 2019). Es más, incluso el tratamiento preventivo, antes de la aparición de la patología propia de la EA, parece tener un efecto neuroprotector limitando la pérdida sináptica en diferentes modelos de EA (Batista y col. 2018, McClean y col. 2015). Sin embargo, hasta donde sabemos, el efecto neuroprotector de la LRGT no se ha comprobado en modelos mixtos, que presentan EA y DM2 concomitantemente. Nuestros resultados, están también en consonancia con trabajos anteriores que evidencian la capacidad neuroprotectora de otros tratamientos antidiabéticos a nivel central cuando ambas patologías coexisten, como la polipíldora antidiabética (Infante-Garcia y col. 2018) o los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa 2 (Esterline y col. 2020, Hierro-Bujalance y col. 2020b).

En cuanto al análisis de la curvatura neuronal, estudios previos en modelos de EA han mostrado una curvatura neurítica anormal en la corteza cerebral (Jackson y col. 2016, Meyer-Luehmann y col. 2008) y un aumento de las distrofias neuríticas que rodean a las placas amiloides (Brendza y col. 2005), indicativos del sufrimiento neuronal y del proceso neurodegenerativo. A nivel funcional, se ha demostrado como las placas amiloides interrumpen la integración sináptica y que la curvatura neurítica juega un papel relevante en estas alteraciones (Stern y col. 2004). En nuestro trabajo observamos que en áreas cerca y lejos de placas amiloides, la curvatura neuronal en animales modelo de EA-DM2 aumentó en comparación con los animales que únicamente padecen EA, lo que apoya un efecto sinérgico entre ambas patologías. La LRGT redujo la curvatura neuronal especialmente en el modelo mixto, y este efecto beneficioso sobre la curvatura neuronal se ha observado con otros tratamientos neuroprotectores en modelos de EA (Garcia-Alloza y col. 2007) y de alteraciones metabólicas (Infante-Garcia y col. 2017a, Ramos-Rodriguez y col. 2017a). Nuestras observaciones están en línea con trabajos anteriores que evidencian que el tratamiento con LRGT mejora la plasticidad sináptica y los procesos de potenciación a largo plazo en animales modelo de EA (McClean y Hölscher 2014a, McClean y Hölscher 2014b) y es posible que, tal y como se ha mostrado en otros modelos, la mejora de la curvatura neuronal sea un proceso subyacente a la mejora funcional observada.

8.4. EFECTO DE LA LRGT EN LA PATOLOGÍA AMILOIDE

Como se ha descrito previamente en los animales APP/PS1 el depósito de placas amiloides comienza alrededor de los 4 meses de edad con afectación cortical preferentemente (Garcia-Alloza y col. 2006b, Jankowsky y col. 2004). Además, se ha visto que los niveles de βA insoluble y el depósito de las placas amiloides son menores en el modelo mixto (APP/PS1xdb/db) (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015). En otro modelo mixto de EA-DM2, el ratón APP/PS1xob/ob se han observado resultados similares, sin que el depósito de placas amiloides se vea afectado (Takeda 2010). En nuestro modelo también sabemos que la densidad de placas amiloides en el hipocampo es todavía limitada a los 6 meses de edad, momento en el que se llevan a cabo nuestros estudios *postmortem* (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015). Sin embargo, en los animales APP/PS1xdb/db las especies de βA oligoméricas,

más tóxicas (Ashe 2020, Bao y col. 2012, Reiss y col. 2018), están aumentadas cuando se comparan con los niveles de oligómeros en animales que únicamente presentan EA. Estos datos están en línea con un estudio que ha evidenciado un aumento de βA oligomérico en otro modelo mixto de EA y DM2 (el ratón $APP^{\Delta NL}/PS1^{P264L}$xdb/db) (Niedowicz y col. 2014).

Tras el tratamiento con LRGT observamos una reducción general de la carga de placas amiloides de núcleo denso y del tamaño de las placas amiloides en los ratones APP/PS1 tratados con LRGT. Esto se acompaña de una ligera reducción en los niveles de βA42 insoluble, lo cual está en línea con trabajos previos en ratones 3xTg modelo de EA (Duarte y col. 2020) que muestran una reducción de βA42 cortical en los cerebros de las hembras tras el tratamiento con LRGT. También detectamos una reducción significativa de los oligómeros de βA en los animales APP/PS1xdb/db, como han mostrado trabajos anteriores en ratones APP/PS1 tratados con LRGT (McClean y Hölscher 2014a). Aunque algunos estudios en modelos de EA no observan cambios en el depósito de placas amiloides tras el tratamiento con LRGT (Hansen y col. 2016b), nuestro trabajo está en consonancia con la mayoría de las observaciones previas que revelan una reducción de las placas amiloides después del tratamiento con LRGT (Batista y col. 2018, Holubová y col. 2019, Jantrapirom y col. 2020, McClean y Hölscher 2014a, McClean y col. 2011). Incluso el tratamiento preventivo de LRGT puede prevenir el depósito de βA (McClean y col. 2015). Además, otros tratamientos antidiabéticos han mostrado su capacidad para limitar la patología amiloide. Así, el novedoso agonista dual GLP1-GIP, DA5-CH, reduce de manera efectiva las placas amiloides en el ratón APP/PS1 (Cao y col. 2018b). Del mismo modo, la polipíldora antidiabética (Infante-Garcia y col. 2018) o la empaglifozina (Hierro-Bujalance y col. 2020b) también limitan la patología amiloidea. Estos datos están en consonancia con trabajos realizados en pacientes con EA y DM2 en los que se ha observado que los enfermos tratados con inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 tenían una carga de amiloide más baja en comparación con los no tratados (Jeong y col. 2021).

Dada la relevancia de la patología βA en la EA, se requerirían más estudios para caracterizar completamente las especies de βA más afectadas por el tratamiento y proporcionar una imagen completa de los cambios observados con la LRGT (Holubová y col. 2019).

En relación al depósito de amiloide como CAA, es necesario tener en cuenta que puede ser responsable de daño cerebrovascular (Milner y col. 2014). Por ello, el estudio de la CAA de los ratones APP/PS1xdb/db podría ser relevante en la progresión de la EA, de acuerdo con estudios epidemiológicos que relacionan la DM2 con la enfermedad vascular (Biessels y Despa 2018, Biessels y Reijmer 2014, Lyu y col. 2020). Sin embargo, cuando analizamos la patología CAA en los vasos penetrantes corticales no observamos diferencias significativas entre los grupos en estudio. Trabajos previos han mostrado un aumento de la CAA cortical en ratones jóvenes modelo de EA-DM2 (APP23xob/ob) (Takeda y col. 2010). Aunque no podemos atribuir esta disparidad a ningún aspecto concreto, es posible que los distintos modelos experimentales usados puedan ser responsables de las diferencias observadas. También es necesario tener en cuenta que nuestros trabajos se realizaron únicamente en vasos penetrantes y no leptomeníngeos, que son los más severamente afectados por la patología amiloide.

8.5. Papel de la LRGT en la patología tau

La hiperfosforilación de tau juega un papel relevante en los procesos neurodegenerativos y los ovillos neurofibrilares son una de las características neuropatológicas clásicas de la EA, por lo que se consideran una posible diana terapéutica de la enfermedad (Chen y col. 2017c, Zhang y col. 2021). Aunque el daño inducido por los ovillos neurofibrilares parece indiscutible, es necesario tener en cuenta que las alteraciones tempranas de tau, antes de la aparición de los ovillos, podrían ser fundamentales en el daño neuronal y en la disfunción cognitiva de los pacientes (Hochgräfe y col. 2013). En nuestros experimentos detectamos un ligero aumento en la fosforilación de tau en los ratones APP/PS1 y db/db, que resulta más severo en los animales APP/PS1xdb/db, en los que se observa un efecto sinérgico. Algunos estudios han mostrado que la resistencia a la insulina puede aumentar la patología tau al interferir en el equilibrio entre las tau quinasas y tau fosfatasas contribuyendo a la hiperfosforilación de la proteína (Mehan y col. 2022, Posner 2017, Seo y col. 2005).

El tratamiento con LRGT disminuyó significativamente la fosforilación de tau cortical en los animales APP/PS1xdb/db en línea con trabajos previos con otros tratamientos antidiaéticos (Hierro-Bujalance y col. 2020b, Infante-Garcia y col. 2018). Además, otros trabajos anteriores también apoyan nuestros resultados ya que se ha descrito que la

LRGT reduce la fosforilación de tau en modelos de diabetes (Ma y col. 2015a, Yang y col. 2013). Este proceso parece estar mediado por el aumento de la señalización de insulina a nivel central y la inactivación de GSK3β, quinasa crucial en la fosforilación de tau (Yang y col. 2013). Por otro lado, también se ha descrito que la LRGT disminuye la fosforilación de tau en diferentes modelos de EA (Batista y col. 2018, Chen y col. 2017c, Holubová y col. 2019, Jantrapirom y col. 2020). Dada la importancia de la patología tau en la EA, el análisis de la reducción de formación de tau es uno de los resultados secundarios previstos del ensayo ELAD (Femminella y col. 2019).

8.6. EFECTO DE LA LRGT EN EL PROCESO INFLAMATORIO

La inflamación es un componente importante tanto de la EA como de la DM2 (Heneka y col. 2015) y estudios previos han sugerido que puede tratarse de uno de los mecanismos subyacentes a la estrecha relación entre ambas patologías (De Felice y Ferreira 2014). Además, la patología inflamatoria y el patrón de activación de citoquinas parece depender en gran manera del subtipo de diabetes o alteración metabólica (prediabetes, DM1 o DM2) que coexista con la patología tipo Alzheimer. En este sentido, en los animales APP/PS1xdb/db se observa que los niveles de βA, glucosa e insulina periféricos se correlacionan con la expresión de citoquinas corticales, apoyando el papel de las alteraciones metabólicas a nivel cerebral (Sankar y col. 2020).

De modo general, los tratamientos hipoglucemiantes muestran actividad antiinflamatoria, controlando la hiperglucemia o actuando directamente en las vías inflamatorias (Kothari y col. 2016). Aunque en nuestro modelo no observamos diferencias significativas cuando analizamos la activación microglial en el hipocampo, estos resultados están en línea con trabajos anteriores del grupo que muestran que la afectación del hipocampo en los animales APP/PS1xdb/db es todavía limitada a las 26 semanas de edad (Infante-Garcia y col. 2016, Ramos-Rodriguez y col. 2015). Nuestro trabajo, sin embargo, revela que el tratamiento con LRGT reduce el proceso inflamatorio cortical. En los animales modelo de EA y en el modelo mixto, la carga microglial disminuye en la proximidad de las placas y este efecto también se observa en el parénquima cortical libre de placas en los animales diabéticos, sugiriendo un papel dual para la LRGT en el proceso inflamatorio, que permite reducir la activación microglial

provocada por el proceso diabético y por la patología tipo Alzheimer de modo simultáneo.

Nuestros resultados están en consonancia con estudios previos que señalan que el tratamiento con LRGT tiene un efecto antiinflamatorio a nivel central y se ha observado una reducción de los niveles de TNF-α o IL-1β en el cerebro en modelos de EA (Duarte y col. 2020, Maskery y col. 2020). Además, disminuye la carga microglial en animales APP/PS1 envejecidos (McClean y Hölscher 2014a), de modo similar a lo que observamos en nuestros animales, y cuando se administra de modo preventivo a animales jóvenes (McClean y col. 2015, McClean y col. 2011). Paralelamente, también se ha descrito la capacidad antiinflamatoria a nivel central en otros modelos de neurodegeneración (Cao y col. 2022, Song y col. 2022, Yuan y col. 2017). Los trabajos sobre el papel antiinflamatorio a nivel cerebral de la LRGT en modelos de diabetes son más limitados, pero muestran una reducción de los procesos oxidativo e inflamatorio cerebrales (Baylan y col. 2022). Del mismo modo, en pacientes con DM1 se observa que la LRGT reduce los niveles de IL-6, aunque esto no supone una mejora de la actividad neuronal cerebral, probablemente debido a que el daño neuropático de los pacientes estudiados es demasiado severo, tal y como apuntan los autores (Brock y col. 2019).

Por otro lado, estudios anteriores también han mostrado la capacidad antiinflamatoria a nivel del SNC de otros agentes antidiabéticos, incluyendo inhibidores del cotransportador sodio-glucosa 2 (Esterline y col. 2020, Hierro-Bujalance y col. 2020b), agentes multidiana (Tai y col. 2018) o terapias combinadas como la polipíldora antidiabética (Infante-Garcia y col. 2018).

8.7. Papel de la LRGT en la patología vascular

Además de las implicaciones de la DM2 a nivel central previamente descritas, los factores de riesgo vascular, en particular la hipertensión y la dislipidemia, también se han asociado al daño cerebral y cognitivo de pacientes con DM2 (Biessels y Despa 2018, Feinkohl y col. 2015). En personas de mediana edad la obesidad, la hipertensión y los niveles altos de colesterol están relacionados con un riesgo mayor de demencia (Anstey y col. 2008, Tolppanen y col. 2014). Es importante considerar que los pacientes con manifestaciones de enfermedad microvascular, como la retinopatía diabética, o

macrovascular como el infarto de miocardio o el accidente cerebrovascular, tienen más riesgo de deterioro cognitivo y una mayor probabilidad de desarrollar demencia (Biessels y col. 2014, Feinkohl y col. 2015). Es más, la patología vascular se ha asociado con la EA y la DM2, y parece observarse un efecto sinérgico cuando ambas enfermedades coexisten (para revisión (Biessels y Despa 2018).

Es ampliamente reconocido que la diabetes se asocia con una disfunción endotelial en varios lechos vasculares como el corazón y el cerebro (Baylan y col. 2022). Además, la diabetes aumenta el estrés oxidativo microvascular, la glicación y la inflamación, complicando la regulación de la microcirculación (Baylan y col. 2022) y la función del endotelio cardiaco (Kibel y col. 2017) y cerebral (van Sloten y col. 2020). Por tanto, la DM2 se relaciona con el daño vascular, incluyendo lesiones cerebrovasculares, y específicamente enfermedad de pequeño vaso, que se ha relacionado con el inicio de la demencia (Bello-Chavolla y col. 2019). Del mismo modo, en animales db/db se ha visto que parámetros microvasculares indicativos de la funcionalidad vascular están significativamente alterados, observándose una hipoperfusión de la microcirculación cerebral (Liu y col. 2021). Además, se detecta una importante reactividad de la microglía que se extiende hasta células endoteliales, lo que puede exacerbar la hipoperfusión cerebral y la hipoxia en el cerebro diabético. Así, las alteraciones patológicas en el modelo db/db pueden contribuir a un mayor daño vascular y al aumento de hemorragias asociadas a procesos neurodegenerativos en la diabetes (Prakash y col. 2013).

En nuestro estudio, el tratamiento con LRGT redujo las hemorragias corticales espontáneas en los ratones modelo de EA-DM2 (APP/PS1xdb/db). Como se ha observado en otros trabajos, la LRGT tiene efectos positivos sobre la vasculatura periférica (Bretón-Romero y col. 2018, de Mesquita y col. 2017) y aunque los trabajos sobre la vasculatura cerebral son más escasos, se ha detectado como la LRGT preserva la integridad de la barrera hematoencefálica en un modelo lesión traumática cerebral (Hakon y col. 2015). También aumenta la densidad de los microvasos y la proliferación de células endoteliales, lo que reduce el volumen cerebral del infarto después de una isquemia cortical (Chen y col. 2018). Por otro lado, tratamientos antidiabéticos como la empaglifozina también mejoran la patología neurovascular en ratones db/db, reduciendo la pérdida de pericitos y células endoteliales (Hayden y col. 2019), además

de prevenir la disfunción endotelial en otros modelos de diabetes (Steven y col. 2017). De la misma forma ocurre con la empaglifozina en los animales APP/PS1Xdb/db (Hierro-Bujalance y col. 2020b), en los que mejora significativamente la carga de microhemorragias en la región más gravemente afectada, la corteza cerebral.

8.8. EFECTO DE LA LRGT EN LA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA

La insulina se une a las subunidades α extracelulares del receptor del IR, lo que lleva a la dimerización y autofosforilación de las subunidades β y la activación de su actividad quinasa. La actividad de la tirosina quinasa de los receptores de insulina permite la fosforilación de los residuos de tirosina en los IRS-1 e IRS-2. Estos reclutan y activan el complejo PI3K que posteriormente fosforila y activa Akt (nodo principal de la cascada de señalización de insulina) y la proteína quinasa C. La Akt activada tiene muchos efectos posteriores, como el control sistémico de la glucosa o la inhibición de la actividad constitutiva de la GSK3β. A través de estas diversas proteínas, la señalización de insulina y de la GSK3β juegan un papel importante en la regulación de la proliferación celular, la migración, la regulación de la glucosa, la apoptosis y la neuroplasticidad (Arnold y col. 2018).

El deterioro en la señalización de insulina se observa de modo general en pacientes con EA (de la Monte 2012, Liu y col. 2011), por lo que trabajos previos se han centrado en el estudio de la posible restauración de la señalización de insulina como estrategia para el tratamiento de la EA (Correia y col. 2011, de la Monte 2012). También las elevaciones basales de IRS1 fosforilado en la serina 616 están asociadas con la resistencia a la insulina, característica patológica de la DM y alteración temprana de la EA (Talbot y col. 2012). La fosforilación del residuo de serina 616 del IRS1 es común tanto en la EA como en la DM y los agentes antidiabéticos como la exenatida restauran las señales de la vía de señalización de insulina IR-IRS1-PI3K-Akt (Bomfim y col. 2012), que es crucial para mantener la plasticidad sináptica y las funciones cognitivas (Bedse y col. 2015, Boucher y col. 2014). La LRGT reduce significativamente las anomalías en el IR en los ratones APP/PS1 y concomitantemente disminuye los niveles de IRS1 fosforilado en la serina 616 (Long-Smith y col. 2013). En nuestros experimentos los niveles de expresión de ARNm de IR-A, IR-B e IGF-1R no se vieron afectados significativamente en ratones APP/PS1xdb/db. Sin embargo, en otros modelos animales de EA similares, como el ratón

Tg2576, se ha observado que los niveles del IGF-1R aumentan en el interior y alrededor de las placas amiloides, por lo que este receptor también se ha considerado un posible vínculo entre la EA y la DM2 (Hölscher 2022, Zheng y Wang 2021). En este punto es necesario tener en cuenta que nuestros estudios no incluyeron análisis funcional, lo que limita el alcance de nuestras observaciones a este nivel.

8.9. Papel de la LRGT en la cognición

Como se ha detectado anteriormente, los ratones modelo de EA-DM2 presentan graves dificultades de aprendizaje y memoria (Infante-Garcia y col. 2016, Niedowicz y col. 2014, Ramos-Rodriguez y col. 2015, Takeda y col. 2010). Dado que la disfunción de señalización de la leptina se ha asociado a complicaciones centrales incluyendo el deterioro cognitivo (Yook y col. 2019), no podemos descartar que nuestros hallazgos puedan deberse, al menos en parte, a la alteración de la señalización de esta hormona (Hierro-Bujalance y col. 2020b, Infante-Garcia y col. 2018).

En nuestro estudio, el aprendizaje espacial y la memoria mejoraron después del tratamiento con la LRGT en el MWM. La memoria episódica también mejoró tras el tratamiento con la LRGT en la prueba de discriminación de nuevo objeto y estudios en pacientes muestran que la memoria episódica se ve afectada de modo temprano en la EA (Ferguson 2021). Asimismo, en pacientes con DM2 y deterioro cognitivo leve, el daño de la memoria episódica se correlaciona con niveles elevados de hemoglobina glicosilada. Paralelamente, la severidad de la DM2 se asocia a un mayor compromiso cognitivo, mientras que los casos leves de DM2 están más relacionados con alteraciones de atención-ejecución (Valenza y col. 2020). Nuestras observaciones están también en línea con trabajos previos en modelos de EA (Chen y col. 2017c, Kamble y col. 2016, McClean y Hölscher 2014a, McClean y col. 2011) y ratones diabéticos (Yan y col. 2019) que evidencian que la LRGT revierte las alteraciones en aprendizaje y memoria en diferentes pruebas conductuales.

Resulta de especial interés el hecho de que el tratamiento con LRGT en pacientes prediabéticos o recientemente diagnosticados con DM2 limite las alteraciones cognitivas en estos pacientes con riesgo elevado de padecer demencia (Vadini y col. 2020) lo que sugiere la posible utilidad del fármaco para ralentizar los trastornos de

memoria en los pacientes diabéticos. Otros ensayos clínicos en pacientes con EA temprana y deterioro cognitivo amnésico leve también han mostrado el efecto beneficioso de tratamientos antidiabéticos (rosiglitazona) en paradigmas que valoran el recuerdo diferido o la atención selectiva (Watson y col. 2005), sentando las bases para la evaluación en curso de la LRGT en el ensayo ELAD (Femminella y col. 2019).

Es posible que todas las alteraciones observadas en nuestro modelo mixto de EA y DM2, incluyendo el daño vascular, la activación de la microglía, la patología amiloide y tau o las alteraciones metabólicas sean responsables de forma sinérgica del deterioro cognitivo observado. En conjunto, nuestros resultados muestran un papel positivo de la LRGT a nivel central cuando EA y DM2 coexisten, como suele observarse en la clínica (Janson y col. 2004). El daño cerebral y el deterioro cognitivo mejoran significativamente, lo que respalda el papel beneficioso de LRGT en el cerebro, así como continuar con los estudios clínicos en pacientes con EA.

IX. CONCLUSIONES

- El tratamiento con LRGT reduce los niveles de glucosa, mantiene los niveles de insulina en los ratones diabéticos (db/db y APP/PS1xdb/db) y el peso corporal en el modelo mixto (APP/PS1xdb/db) a largo plazo. La mejora de las alteraciones metabólicas en los ratones diabéticos respalda el papel de la LRGT en el mantenimiento de la actividad pancreática especialmente en el modelo mixto de EA-DM2.

- La atrofia cortical disminuye en los animales diabéticos (db/db y APP/PS1xdb/db) tratados con LRGT. Paralelamente el tratamiento mejora la densidad neuronal en regiones próximas y alejadas de las placas amiloides. Así mismo, la LRGT reduce la curvatura neuronal cerca y lejos de placas amiloides en el modelo de EA-DM2, reforzando papel neuroprotector de la LRGT.

- El tratamiento con LRGT mejora la patología amiloide al disminuir la carga y el tamaño de placas amiloides corticales en ratones APP/PS1. En los animales APP/PS1xdb/db el tratamiento con LRGT reduce los niveles de βA oligomérico en la corteza.

- El tratamiento con LRGT reduce la relación fosfo-tau/tau-total en la corteza de los ratones APP/PS1xdb/db, limitando el daño neuronal.

- Después del tratamiento con LRGT se observa una disminución significativa de la carga de microhemorragias corticales en los animales modelo de EA-DM2, mejorando la patología de pequeño vaso.

- La LRGT reduce la activación de la microglía cerca y lejos de placas amiloides en los animales con patología tipo Alzheimer (APP/PS1 y APP/PS1xdb/db). También disminuye la carga microglial en regiones sin placas en animales con patología diabética (db/db y APP/PS1xdb/db), apoyando el papel beneficioso de la LRGT en la inflamación propia de la EA y la DM2.

IX. CONCLUSIONES

- La memoria episódica en el modelo mixto (APP/PS1xdb/db) mejora significativamente y se reduce el compromiso de la memoria espacial en los animales diabéticos (db/db y APP/PS1xdb/db) tras el tratamiento con LRGT. Estos resultados respaldan la capacidad de la LRGT para mejorar el deterioro cognitivo de los animales modelo de DM2 y de EA-DM2.

- En conjunto nuestros resultados muestran que el tratamiento con LRGT mejora las alteraciones metabólicas y cerebrales en un modelo murino mixto de EA y DM2. El tratamiento a largo plazo mejora la patología tipo Alzheimer reduciendo los niveles de amiloide oligomérico y los niveles de tau hiperfosforilado. También se observa una disminución de la atrofia cerebral acompañada del mantenimiento de la población neuronal y de la curvatura neurítica. La activación microglial y el daño de pequeño vaso se reducen tras el tratamiento con LRGT y observamos una mejora generalizada de los problemas cognitivos en nuestros animales. Nuestro estudio respalda la posible utilidad de la LRGT a nivel central cuando EA y DM2 coexisten, como ocurre habitualmente en la clínica.

X. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed I, Goldstein B. 2006a. Diabetes mellitus. *Clinics in dermatology* 24: 237-46

Ahmed I, Goldstein BJ. 2006b. Cardiovascular risk in the spectrum of type 2 diabetes mellitus. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 73: 759-68

Akhtar A, Sah SP. 2020. Insulin signaling pathway and related molecules: Role in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Neurochemistry international* 135: 104707

Alzheimer_Europe. 2020. Dementia in Europe Yearbook 2019: Stimating the prevalence of dementia in Europe.

Alzheimer´s_Association. 2021. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. 17: 327-406

Alzheimer's_Disease_International. 2018. World Alzheimer Report 2018. The state of the art of dementia research: new frontiers.

American_Diabetes_Association. 2020. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes 2020. *Diabetes Care* 43: S14-S31

Anstey KJ, Lipnicki DM, Low LF. 2008. Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of prospective studies with meta-analysis. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 16: 343-54

Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang HY, et al. 2018. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nature reviews. Neurology* 14: 168-81

Arnsten AFT, Datta D, Del Tredici K, Braak H. 2021. Hypothesis: Tau pathology is an initiating factor in sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 17: 115-24

Arvanitakis Z, Shah RC, Bennett DA. 2019. Diagnosis and Management of Dementia: Review. *Jama* 322: 1589-99

Ashe KH. 2020. The biogenesis and biology of amyloid β oligomers in the brain. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 16: 1561-67

Athar T, Al Balushi K, Khan SA. 2021. Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Molecular biology reports* 48: 5629-45

Bao F, Wicklund L, Lacor PN, Klein WL, Nordberg A, Marutle A. 2012. Different β-amyloid oligomer assemblies in Alzheimer brains correlate with age of disease onset and impaired cholinergic activity. *Neurobiol Aging* 33: 825.e1-13

Baranello RJ, Bharani KL, Padmaraju V, Chopra N, Lahiri DK, et al. 2015. Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* 12: 32-46

Batista AF, Forny-Germano L, Clarke JR, Lyra ESNM, Brito-Moreira J, et al. 2018. The diabetes drug liraglutide reverses cognitive impairment in mice and attenuates insulin receptor and synaptic pathology in a non-human primate model of Alzheimer's disease. *The Journal of pathology* 245: 85-100

Batool Z, Sadir S, Liaquat L, Tabassum S, Madiha S, et al. 2016. Repeated administration of almonds increases brain acetylcholine levels and enhances memory function in healthy rats while attenuates memory deficits in animal model of amnesia. *Brain research bulletin* 120: 63-74

X. BIBLIOGRAFÍA

Baylan U, Korn A, Emmens RW, Schalkwijk CG, Wm Niessen H, et al. 2022. Liraglutide treatment attenuates inflammation markers in the cardiac, cerebral and renal microvasculature in streptozotocin-induced diabetic rats. *European journal of clinical investigation*: e13807

Bedse G, Di Domenico F, Serviddio G, Cassano T. 2015. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge. *Frontiers in neuroscience* 9: 204

Beeri MS, Bendlin BB. 2020. The link between type 2 diabetes and dementia: from biomarkers to treatment. *The lancet. Diabetes & endocrinology* 8: 736-38

Bello-Chavolla OY, Antonio-Villa NE, Vargas-Vázquez A, Ávila-Funes JA, Aguilar-Salinas CA. 2019. Pathophysiological Mechanisms Linking Type 2 Diabetes and Dementia: Review of Evidence from Clinical, Translational and Epidemiological Research. *Current diabetes reviews* 15: 456-70

Bendlin BB. 2019. Antidiabetic therapies and Alzheimer disease. *Dialogues in clinical neuroscience* 21: 83-91

Benhamron S, Rozenstein-Tsalkovich L, Nitzan K, Abramsky O, Rosenmann H. 2018. Phos-tau peptide immunization of amyloid-tg-mice reduced non-mutant phos-tau pathology, improved cognition and reduced amyloid plaques. *Experimental neurology* 303: 48-58

Bernardes G, Ijzerman RG, Ten Kulve JS, Barkhof F, Diamant M, et al. 2018. Cortical and subcortical gray matter structural alterations in normoglycemic obese and type 2 diabetes patients: relationship with adiposity, glucose, and insulin. *Metabolic brain disease* 33: 1211-22

Bharadwaj P, Wijesekara N, Liyanapathirana M, Newsholme P, Ittner L, et al. 2017. The Link between Type 2 Diabetes and Neurodegeneration: Roles for Amyloid-β, Amylin, and Tau Proteins. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 59: 421-32

Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J. 2004. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *Journal of neurochemistry* 89: 1313-7

Biessels GJ, Despa F. 2018. Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications. *Nature reviews. Endocrinology* 14: 591-604

Biessels GJ, Reijmer YD. 2014. Brain changes underlying cognitive dysfunction in diabetes: what can we learn from MRI? *Diabetes* 63: 2244-52

Biessels GJ, Strachan MW, Visseren FL, Kappelle LJ, Whitmer RA. 2014. Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions. *The lancet. Diabetes & endocrinology* 2: 246-55

Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. 2005. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45: 675-88

Biogen_Inc.ADUHELM™. 2021. Aducanumab-avwa: información de prescripción de EE. UU. 2021. Acceso: 5 de julio. Url: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/

Birks JS, Harvey RJ. 2018. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *The Cochrane database of systematic reviews* 6: Cd001190

Bomba M, Granzotto A, Castelli V, Onofrj M, Lattanzio R, et al. 2019. Exenatide Reverts the High-Fat-Diet-Induced Impairment of BDNF Signaling and Inflammatory Response in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 70: 793-810

Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, Brito-Moreira J, Houzel JC, et al. 2012. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease- associated Aβ oligomers. *The Journal of clinical investigation* 122: 1339-53

Bommer C, Sagalova V, Heesemann E, Manne-Goehler J, Atun R, et al. 2018. Global Economic Burden of Diabetes in Adults: Projections From 2015 to 2030. *Diabetes Care* 41: 963-70

Borse SP, Chhipa AS, Sharma V, Singh DP, Nivsarkar M. 2021. Management of Type 2 Diabetes: Current Strategies, Unfocussed Aspects, Challenges, and Alternatives. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre* 30: 109-21

Bosco D, Fava A, Plastino M, Montalcini T, Pujia A. 2011. Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Cell Mol Med* 15: 1807-21

Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. 2014. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6

Brendza RP, Bacskai BJ, Cirrito JR, Simmons KA, Skoch JM, et al. 2005. Anti-Abeta antibody treatment promotes the rapid recovery of amyloid-associated neuritic dystrophy in PDAPP transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* 115: 428-33

Bretón-Romero R, Weisbrod RM, Feng B, Holbrook M, Ko D, et al. 2018. Liraglutide Treatment Reduces Endothelial Endoplasmic Reticulum Stress and Insulin Resistance in Patients With Diabetes Mellitus. *Journal of the American Heart Association* 7: e009379

Brock C, Hansen CS, Karmisholt J, Møller HJ, Juhl A, et al. 2019. Liraglutide treatment reduced interleukin-6 in adults with type 1 diabetes but did not improve established autonomic or polyneuropathy. *British journal of clinical pharmacology* 85: 2512-23

Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. 2011. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*

Bull FC, Al-Ansari SS, Biddle S, Borodulin K, Buman MP, et al. 2020. World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *British journal of sports medicine* 54: 1451-62

Burns DK, Alexander RC, Welsh-Bohmer KA, Culp M, Chiang C, et al. 2021. Safety and efficacy of pioglitazone for the delay of cognitive impairment in people at risk of Alzheimer's disease (TOMMORROW): a prognostic biomarker study and a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet. Neurology* 20: 537-47

Burns JM, Honea RA, Vidoni ED, Hutfles LJ, Brooks WM, Swerdlow RH. 2012. Insulin is differentially related to cognitive decline and atrophy in Alzheimer's disease and aging. *Biochim Biophys Acta* 1822: 333-39

Buteau J. 2008. GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival. *Diabetes Metab* 34 Suppl 2: S73-7

Cai HY, Yang JT, Wang ZJ, Zhang J, Yang W, et al. 2018. Lixisenatide reduces amyloid plaques, neurofibrillary tangles and neuroinflammation in an APP/PS1/tau mouse model of Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications* 495: 1034-40

Calderon-Garcidueñas AL, Duyckaerts C. 2017. Alzheimer disease. *Handbook of clinical neurology* 145: 325-37

Callisaya ML, Beare R, Moran C, Phan T, Wang W, Srikanth VK. 2019. Type 2 diabetes mellitus, brain atrophy and cognitive decline in older people: a longitudinal study. *Diabetologia* 62: 448-58

Calsolaro V, Edison P. 2016. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 12: 719-32

Canepa E, Fossati S. 2020. Impact of Tau on Neurovascular Pathology in Alzheimer's Disease. *Frontiers in neurology* 11: 573324

Cao B, Rosenblat JD, Brietzke E, Park C, Lee Y, et al. 2018a. Comparative efficacy and acceptability of antidiabetic agents for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A systematic review and network meta-analysis. *Diabetes, obesity & metabolism* 20: 2467-71

Cao B, Zhang Y, Chen J, Wu P, Dong Y, Wang Y. 2022. Neuroprotective effects of liraglutide against inflammation through the AMPK/NF-κB pathway in a mouse model of Parkinson's disease. *Metabolic brain disease* 37: 451-62

Cao Y, Hölscher C, Hu MM, Wang T, Zhao F, et al. 2018b. DA5-CH, a novel GLP-1/GIP dual agonist, effectively ameliorates the cognitive impairments and pathology in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 827: 215-26

Carmona S, Zahs K, Wu E, Dakin K, Bras J, Guerreiro R. 2018. The role of TREM2 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *The Lancet. Neurology* 17: 721-30

Carranza-Naval MJ, Del Marco A, Hierro-Bujalance C, Alves-Martinez P, Infante-Garcia C, et al. 2021. Liraglutide Reduces Vascular Damage, Neuronal Loss, and Cognitive Impairment in a Mixed Murine Model of Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. *Frontiers in aging neuroscience* 13: 741923

Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, et al. 2011. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-β peptide clearance. *Science translational medicine* 3: 89ra57

Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. 2017. Type 2 diabetes. *Lancet (London, England)* 389: 2239-51

Chatterjee S, Mudher A. 2018. Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes: A Critical Assessment of the Shared Pathological Traits. *Frontiers in neuroscience* 12: 383

Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. 2009. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In vivo (Athens, Greece)* 23: 245-58

Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, et al. 2000. A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 975-9

Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, et al. 2017a. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta pharmacologica Sinica* 38: 1205-35

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, et al. 1996. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84: 491-5

Chen J, Zhang J, Liu X, Wang X, Xu X, et al. 2017b. Abnormal subcortical nuclei shapes in patients with type 2 diabetes mellitus. *European radiology* 27: 4247-56

Chen LN, Lyu J, Yang XF, Ji WJ, Yuan BX, et al. 2013. Liraglutide ameliorates glycometabolism and insulin resistance through the upregulation of GLUT4 in diabetic KKAy mice. *International journal of molecular medicine* 32: 892-900

Chen S, Sun J, Zhao G, Guo A, Chen Y, et al. 2017c. Liraglutide Improves Water Maze Learning and Memory Performance While Reduces Hyperphosphorylation of Tau and Neurofilaments in APP/PS1/Tau Triple Transgenic Mice. *Neurochemical Research* 42: 2326-35

Chen Y, Liang Z, Tian Z, Blanchard J, Dai CL, et al. 2014. Intracerebroventricular streptozotocin exacerbates Alzheimer-like changes of 3xTg-AD mice. *Mol Neurobiol* 49: 547-62

Chen Y, Zhang X, He J, Xie Y, Yang Y. 2018. Delayed Administration of the Glucagon-Like Peptide 1 Analog Liraglutide Promoting Angiogenesis after Focal Cerebral Ischemia in Mice. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 27: 1318-25

Chin-Chan M, Maldonado-Velázquez MG, Mex-Álvarez R, Garma-Quen PM, Cobos-Puc L. 2018. [Amyloid-degrading enzymes in Alzheimer´s disease: from molecules to genetic therapy]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 56: 387-94

Chiu SL, Chen CM, Cline HT. 2008. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. *Neuron* 58: 708-19

Coleman DL. 1978. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14: 141-8

Correia SC, Santos RX, Perry G, Zhu X, Moreira PI, Smith MA. 2011. Insulin-resistant brain state: the culprit in sporadic Alzheimer's disease? *Ageing research reviews* 10: 264-73

Courreges JP, Vilsboll T, Zdravkovic M, Le-Thi T, Krarup T, et al. 2008. Beneficial effects of once-daily liraglutide, a human glucagon-like peptide-1 analogue, on cardiovascular risk biomarkers in patients with Type 2 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 25: 1129-31

Craft S. 2009. The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. *Archives of neurology* 66: 300-5

Craft S, Raman R, Chow TW, Rafii MS, Sun CK, et al. 2020. Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol* 77: 1099-109

Crous-Bou M, Minguillón C, Gramunt N, Molinuevo JL. 2017. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimer's research & therapy* 9: 71

Cummings J, Ortiz A, Castellino J, Kinney J. 2022. Diabetes: Risk factor and translational therapeutic implications for Alzheimer's disease. *The European journal of neuroscience*

Dal-Ré R. 2022. [The European Medicines Agency rejects the authorization of aducanumab for Alzheimer's disease]. *Revista de neurologia* 74: 207-08

Dawson TM, Golde TE, Lagier-Tourenne C. 2018. Animal models of neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience* 21: 1370-79

De Felice FG, Ferreira ST. 2014. Inflammation, defective insulin signaling, and mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting type 2 diabetes to Alzheimer disease. *Diabetes* 63: 2262-72

de la Monte SM. 2012. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* 9: 35-66

de Mesquita FC, Guixé-Muntet S, Fernández-Iglesias A, Maeso-Díaz R, Vila S, et al. 2017. Liraglutide improves liver microvascular dysfunction in cirrhosis: Evidence from translational studies. *Sci Rep* 7: 3255

Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. 2005. Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of learning and memory* 84: 214-21

Desai S, Deshmukh A. 2020. Mapping of Type 1 Diabetes Mellitus. *Current diabetes reviews* 16: 438-41

Desestret V, Brisset JC, Moucharrafie S, Devillard E, Nataf S, et al. 2009. Early-stage investigations of ultrasmall superparamagnetic iron oxide-induced signal change after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Stroke* 40: 1834-41

Diaz-Valencia PA, Bougnères P, Valleron AJ. 2015. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC public health* 15: 255

Drummond E, Wisniewski T. 2017. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta neuropathologica* 133: 155-75

Duarte AI, Candeias E, Alves IN, Mena D, Silva DF, et al. 2020. Liraglutide Protects Against Brain Amyloid-β(1-42) Accumulation in Female Mice with Early Alzheimer's Disease-Like Pathology by Partially Rescuing Oxidative/Nitrosative Stress and Inflammation. *International journal of molecular sciences* 21

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, et al. 2010. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* 9: 1118-27

Duggan SP, McCarthy JV. 2016. Beyond γ-secretase activity: The multifunctional nature of presenilins in cell signalling pathways. *Cellular signalling* 28: 1-11

During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, et al. 2003. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nature medicine* 9: 1173-9

Echouffo-Tcheugui JB, Selvin E. 2021. Prediabetes and What It Means: The Epidemiological Evidence. *Annual review of public health* 42: 59-77

Eckman EA, Eckman CB. 2005. Abeta-degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention. *Biochemical Society transactions* 33: 1101-5

El Khoury NB, Gratuze M, Papon MA, Bretteville A, Planel E. 2014. Insulin dysfunction and Tau pathology. *Frontiers in cellular neuroscience* 8: 22

Elseady WS, Abd Ellatif RA, Estfanous RS, Emam MN, Keshk WA. 2021. New insight on the role of liraglutide in alleviating dexamethasone-induced pancreatic cytotoxicity via improving redox status, autophagy flux, and PI3K/Akt/Nrf2 signaling. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 99: 1217-25

Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Villegas S. 2017. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 57: 1171-83

Esser N, Zraika S. 2019. Neprilysin inhibition: a new therapeutic option for type 2 diabetes? *Diabetologia* 62: 1113-22

Esterline R, Oscarsson J, Burns J. 2020. Chapter Five - A role for sodium glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2is) in the treatment of Alzheimer's disease? In *International Review of Neurobiology*, ed. G Söderbom, R Esterline, J Oscarsson, MP Mattson, pp. 113-40: Academic Press

Ettcheto M, Sánchez-López E, Gómez-Mínguez Y, Cabrera H, Busquets O, et al. 2018. Peripheral and Central Effects of Memantine in a Mixed Preclinical Mice Model of Obesity and Familial Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 55: 7327-39

European_Medicines_Agency. 2021. Refusal of marketing authorisation for Aduhelm (aducanumab). EMA/750220/2021. Acceso: 20 febrero 2022. Url: https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/refusal-marketing-authorisation-aduhelm-aducanumab_en.pdf

Fan M, Jiang H, Zhang Y, Ma Y, Li L, Wu J. 2018. Liraglutide Enhances Autophagy and Promotes Pancreatic β Cell Proliferation to Ameliorate Type 2 Diabetes in High-Fat-Fed and Streptozotocin-Treated Mice. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 24: 2310-16

Farr OM, Sofopoulos M, Tsoukas MA, Dincer F, Thakkar B, et al. 2016. GLP-1 receptors exist in the parietal cortex, hypothalamus and medulla of human brains and the GLP-1 analogue liraglutide alters brain activity related to highly desirable food cues in individuals with diabetes: a crossover, randomised, placebo-controlled trial. *Diabetologia* 59: 954-65

Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, et al. 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: 4162-7

Feinkohl I, Price JF, Strachan MW, Frier BM. 2015. The impact of diabetes on cognitive decline: potential vascular, metabolic, and psychosocial risk factors. *Alzheimer's research & therapy* 7: 46

Femminella GD, Edison P. 2014. Evaluation of neuroprotective effect of glucagon-like peptide 1 analogs using neuroimaging. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 10: S55-61

Femminella GD, Frangou E, Love SB, Busza G, Holmes C, et al. 2019. Evaluating the effects of the novel GLP-1 analogue liraglutide in Alzheimer's disease: study protocol for a randomised controlled trial (ELAD study). *Trials* 20: 191

Ferguson C. 2021. A network psychometric approach to neurocognition in early Alzheimer's disease. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior* 137: 61-73

Fewlass DC, Noboa K, Pi-Sunyer FX, Johnston JM, Yan SD, Tezapsidis N. 2004. Obesity-related leptin regulates Alzheimer's Abeta. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 1870-8

Fischer AW, Cannon B, Nedergaard J. 2020. Leptin: Is It Thermogenic? *Endocrine reviews* 41: 232-60

Folch J, Ettcheto M, Petrov D, Abad S, Pedrós I, et al. 2018. Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: Strategies for combating β-amyloid protein. *Neurologia (Barcelona, Spain)* 33: 47-58

Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM. 2017. Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends in neurosciences* 40: 347-57

Frame S, Cohen P. 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *The Biochemical journal* 359: 1-16

Gabbouj S, Ryhänen S, Marttinen M, Wittrahm R, Takalo M, et al. 2019. Altered Insulin Signaling in Alzheimer's Disease Brain - Special Emphasis on PI3K-Akt Pathway. *Frontiers in neuroscience* 13: 629

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, et al. 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523-7

Garcia-Alloza M, Borrelli LA, Rozkalne A, Hyman BT, Bacskai BJ. 2007. Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *Journal of neurochemistry* 102: 1095-104

Garcia-Alloza M, Dodwell SA, Meyer-Luehmann M, Hyman BT, Bacskai BJ. 2006a. Plaque-derived oxidative stress mediates distorted neurite trajectories in the Alzheimer mouse model. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65: 1082-9

Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky RA, et al. 2006b. Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease* 24: 516-24

Garre-Olmo J. 2018. [Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias]. *Revista de neurologia* 66: 377-86

Gejl M, Brock B, Egefjord L, Vang K, Rungby J, Gjedde A. 2017. Blood-Brain Glucose Transfer in Alzheimer's disease: Effect of GLP-1 Analog Treatment. *Scientific Reports* 7: 17490

Gejl M, Gjedde A, Egefjord L, Møller A, Hansen SB, et al. 2016. In Alzheimer's Disease, 6-Month Treatment with GLP-1 Analog Prevents Decline of Brain Glucose Metabolism: Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial. *Frontiers in aging neuroscience* 8: 108

Gómez de Barreda E, Pérez M, Gómez Ramos P, de Cristobal J, Martín-Maestro P, et al. 2010. Tau-knockout mice show reduced GSK3-induced hippocampal degeneration and learning deficits. *Neurobiol Dis* 37: 622-9

Goodall R, Alazawi A, Hughes W, Bravis V, Salciccioli JD, et al. 2021. Trends in type 2 diabetes mellitus disease burden in European Union countries between 1990 and 2019. *Sci Rep* 11: 15356

Green A, Hede SM, Patterson CC, Wild SH, Imperatore G, et al. 2021. Type 1 diabetes in 2017: global estimates of incident and prevalent cases in children and adults. *Diabetologia* 64: 2741-50

Greenberg SM. 2013. Stroke after Alzheimer disease: I have more bad news. *Neurology* 80: 695-6

Grieco M, Giorgi A, Gentile MC, d'Erme M, Morano S, et al. 2019. Glucagon-Like Peptide-1: A Focus on Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in neuroscience* 13: 1112

Grossberg GT MF, Allegri RF, Gutiérrez-Robledo LM, Gloger S, Xie L, Jia XD, Pejović V, Miller ML, Perhach JL, Graham SM. . 2013. The safety, tolerability, and efficacy of once-daily memantine (28 mg): a multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients with moderate-to-severe Alzheimer's disease taking cholinesterase inhibitors. *CNS Drugs* 27: 469-78

Hakon J, Ruscher K, Romner B, Tomasevic G. 2015. Preservation of the blood brain barrier and cortical neuronal tissue by liraglutide, a long acting glucagon-like-1 analogue, after experimental traumatic brain injury. *PloS one* 10: e0120074

Hamaguchi T, Kim JH, Hasegawa A, Goto R, Sakai K, et al. 2021. Exogenous Aβ seeds induce Aβ depositions in the blood vessels rather than the brain parenchyma, independently of Aβ strain-specific information. *Acta neuropathologica communications* 9: 151

Hamilton A, Hölscher C. 2009. Receptors for the incretin glucagon-like peptide-1 are expressed on neurons in the central nervous system. *Neuroreport* 20: 1161-6

Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, et al. 2021. The Amyloid-β Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry*

Han W-N, Hölscher C, Yuan L, Yang W, Wang X-H, et al. 2013. Liraglutide protects against amyloid-β protein-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Neurobiology of Aging* 34: 576-88

Hansen HH, Barkholt P, Fabricius K, Jelsing J, Terwel D, et al. 2016a. The GLP-1 receptor agonist liraglutide reduces pathology-specific tau phosphorylation and improves motor function in a transgenic hTauP301L mouse model of tauopathy. *Brain Res* 1634: 158-70

Hansen HH, Fabricius K, Barkholt P, Kongsbak-Wismann P, Schlumberger C, et al. 2016b. Long-Term Treatment with Liraglutide, a Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Receptor Agonist, Has No Effect on β-Amyloid Plaque Load in Two Transgenic APP/PS1 Mouse Models of Alzheimer's Disease. *PloS one* 11: e0158205

Hansen HH, Fabricius K, Barkholt P, Niehoff ML, Morley JE, et al. 2015. The GLP-1 Receptor Agonist Liraglutide Improves Memory Function and Increases Hippocampal CA1 Neuronal Numbers in a Senescence-Accelerated Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 46: 877-88

Hashioka S, Wu Z, Klegeris A. 2021. Glia-Driven Neuroinflammation and Systemic Inflammation in Alzheimer's Disease. *Current neuropharmacology* 19: 908-24

Hayden MR, Grant DG, Aroor AR, DeMarco VG. 2019. Empagliflozin Ameliorates Type 2 Diabetes-Induced Ultrastructural Remodeling of the Neurovascular Unit and Neuroglia in the Female db/db Mouse. *Brain sciences* 9

He W, Tian X, Lv M, Wang H. 2018. Liraglutide Protects Neurite Outgrowth of Cortical Neurons Under Oxidative Stress though Activating the Wnt Pathway. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 27: 2696-702

He W, Wang H, Zhao C, Tian X, Li L, Wang H. 2020. Role of liraglutide in brain repair promotion through Sirt1-mediated mitochondrial improvement in stroke. *Journal of cellular physiology* 235: 2986-3001

Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, et al. 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology* 14: 388-405

Heras-Sandoval D, Ferrera P, Arias C. 2012. Amyloid-β protein modulates insulin signaling in presynaptic terminals. *Neurochem Res* 37: 1879-85

Hernández F, Gómez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J. 2010. GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Experimental neurology* 223: 322-5

Hershey LA, Tarawneh R. 2021. Clinical Efficacy, Drug Safety and Surrogate Endpoints: Has Aducanumab Met All of Its Expectations? *Neurology*

Hierro-Bujalance C, Del Marco A, Jose Ramos-Rodriguez J, Infante-Garcia C, Bella Gomez-Santos S, et al. 2020a. Cell proliferation and neurogenesis alterations in Alzheimer's disease and diabetes mellitus mixed murine models. *Journal of neurochemistry* 154: 673-92

Hierro-Bujalance C, Garcia-Alloza M. 2020. Chapter 1: Cognitive Alterations in Preclinical Models of Diabetes Mellitus In *Horizons in Neuroscience Research*, ed. V E.Nova Medicine & Health New York: 41

Hierro-Bujalance C, Infante-Garcia C, Del Marco A, Herrera M, Carranza-Naval MJ, et al. 2020b. Empagliflozin reduces vascular damage and cognitive impairment in a mixed murine model of Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Alzheimer's research & therapy* 12: 40

Hiltunen M, Khandelwal VK, Yaluri N, Tiilikainen T, Tusa M, et al. 2012. Contribution of genetic and dietary insulin resistance to Alzheimer phenotype in APP/PS1 transgenic mice. *Journal of cellular and molecular medicine* 16: 1206-22

Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, 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: 902-4

Hobday AL, Parmar MS. 2021. The Link Between Diabetes Mellitus and Tau Hyperphosphorylation: Implications for Risk of Alzheimer's Disease. *Cureus* 13: e18362

Hochgräfe K, Sydow A, Mandelkow EM. 2013. Regulatable transgenic mouse models of Alzheimer disease: onset, reversibility and spreading of Tau pathology. *The FEBS journal* 280: 4371-81

Holscher C. 2018. Novel dual GLP-1/GIP receptor agonists show neuroprotective effects in Alzheimer's and Parkinson's disease models. *Neuropharmacology*

Hölscher C. 2022. Protective properties of GLP-1 and associated peptide hormones in neurodegenerative disorders. *British journal of pharmacology* 179: 695-714

Holubová M, Hrubá L, Popelová A, Bencze M, Pražienková V, et al. 2019. Liraglutide and a lipidized analog of prolactin-releasing peptide show neuroprotective effects in a mouse model of β-amyloid pathology. *Neuropharmacology* 144: 377-87

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, et al. 1996. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science (New York, N.Y.)* 274: 99-102

Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. 1966. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science (New York, N.Y.)* 153: 1127-8

Hung SY, Fu WM. 2017. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *Journal of biomedical science* 24: 47

Ighodaro OM, Adeosun AM, Akinloye OA. 2017. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 53: 365-74

Ikram MA, Brusselle G, Ghanbari M, Goedegebure A, Ikram MK, et al. 2020. Objectives, design and main findings until 2020 from the Rotterdam Study. *European journal of epidemiology* 35: 483-517

Infante-Garcia C, Jose Ramos-Rodriguez J, Marin-Zambrana Y, Teresa Fernandez-Ponce M, Casas L, et al. 2017a. Mango leaf extract improves central pathology and cognitive impairment in a type 2 diabetes mouse model. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 27: 499-507

Infante-Garcia C, Ramos-Rodriguez JJ, Delgado-Olmos I, Gamero-Carrasco C, Fernandez-Ponce MT, et al. 2017b. Long-Term Mangiferin Extract Treatment Improves Central Pathology and Cognitive Deficits in APP/PS1 Mice. *Mol Neurobiol* 54: 4696-704

Infante-Garcia C, Ramos-Rodriguez JJ, Galindo-Gonzalez L, Garcia-Alloza M. 2016. Long-term central pathology and cognitive impairment are exacerbated in a mixed model of Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Psychoneuroendocrinology* 65: 15-25

Infante-Garcia C, Ramos-Rodriguez JJ, Hierro-Bujalance C, Ortegon E, Pickett E, et al. 2018. Antidiabetic Polypill Improves Central Pathology and Cognitive Impairment in a Mixed Model of Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. *Mol Neurobiol* 55: 6130-44

Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. 1950. Obese, a new mutation in the house mouse. *The Journal of heredity* 41: 317-8

International_Diabetes_Federation. 2019. *IDF Diabetes Atlas*. Belgium: International Diabetes Federation.

Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 2008. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *Journal of cellular and molecular medicine* 12: 38-55

Jacka FN, Cherbuin N, Anstey KJ, Sachdev P, Butterworth PJBm. 2015. Western diet is associated with a smaller hippocampus: a longitudinal investigation. 13: 1-8

Jackson RJ, Rudinskiy N, Herrmann AG, Croft S, Kim JM, et al. 2016. Human tau increases amyloid β plaque size but not amyloid β-mediated synapse loss in a novel mouse model of Alzheimer's disease. *The European journal of neuroscience* 44: 3056-66

Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, et al. 2004. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Human Molecular Genetics* 13: 159-70

Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC. 2004. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* 53: 474-81

Jantrapirom S, Nimlamool W, Chattipakorn N, Chattipakorn S, Temviriyanukul P, et al. 2020. Liraglutide Suppresses Tau Hyperphosphorylation, Amyloid Beta Accumulation through Regulating Neuronal Insulin Signaling and BACE-1 Activity. *International journal of molecular sciences* 21

Janus C, Flores AY, Xu G, Borchelt DR. 2015. Behavioral abnormalities in APPSwe/PS1dE9 mouse model of AD-like pathology: comparative analysis across multiple behavioral domains. *Neurobiology of Aging* 36: 2519-32

Jeong SH, Kim HR, Kim J, Kim H, Hong N, et al. 2021. Association of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Use and Amyloid Burden in Patients With Diabetes and AD-Related Cognitive Impairment. 97: e1110-e22

Jiang J, Jiang HJNS. 2015. Efficacy and adverse effects of memantine treatment for Alzheimer's disease from randomized controlled trials. 36: 1633-41

Johnson LA, Torres ERS, Impey S, Stevens JF, Raber J. 2017. Apolipoprotein E4 and Insulin Resistance Interact to Impair Cognition and Alter the Epigenome and Metabolome. *Scientific Reports* 7: 43701

Julien C, Tremblay C, Phivilay A, Berthiaume L, Emond V, et al. 2010. High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol Aging* 31: 1516-31

Kalscheuer H, Serfling G, Schmid S, Lehnert H. 2017. [Diabetic emergencies : Hypoglycemia, ketoacidotic and hyperglycemic hyperosmolar nonketotic coma]. *Der Internist* 58: 1020-28

Kamble M, Gupta R, Rehan HS, Gupta LK. 2016. Neurobehavioral effects of liraglutide and sitagliptin in experimental models. *Eur J Pharmacol* 774: 64-70

Kandar CC, Sen D, Maity A. 2021. Anti-inflammatory Potential of GSK-3 Inhibitors. *Current drug targets* 22: 1464-76

Kang S, Lee YH, Lee JE. 2017. Metabolism-Centric Overview of the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Yonsei medical journal* 58: 479-88

Kapodistria K, Tsilibary E-P, Kotsopoulou E, Moustardas P, Kitsiou P. 2018. Liraglutide, a human glucagon-like peptide-1 analogue, stimulates AKT-dependent survival signalling and inhibits pancreatic β-cell apoptosis. *Journal of cellular and molecular medicine* 22: 2970-80

Karvani M, Simos P, Stavrakaki S, Kapoukranidou D. 2019. Neurocognitive impairment in type 2 diabetes mellitus. *Hormones (Athens, Greece)* 18: 523-34

Katsurada K, Yada T. 2016. Neural effects of gut- and brain-derived glucagon-like peptide-1 and its receptor agonist. *Journal of diabetes investigation* 7 Suppl 1: 64-9

Katzmarski N, Ziegler-Waldkirch S, Scheffler N, Witt C, Abou-Ajram C, et al. 2020. Aβ oligomers trigger and accelerate Aβ seeding. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 30: 36-45

Kellar D, Craft S. 2020. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches. *The Lancet. Neurology* 19: 758-66

Khan MAB, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Al Kaabi J. 2020. Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J Epidemiol Glob Health* 10: 107-11

Khoury R RJ, Grossberg GT. 2018. An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. . *Ther Adv Drug Saf.* 9: 171-78

Kibel A, Selthofer-Relatic K, Drenjancevic I, Bacun T, Bosnjak I, et al. 2017. Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus. *The Journal of international medical research* 45: 1901-29

Kim SH, Abbasi F, Nachmanoff C, Stefanakis K, Kumar A, et al. 2021. Effect of the glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide versus placebo treatment on circulating proglucagon-derived peptides that mediate improvements in body weight, insulin secretion and action: A randomized controlled trial. *Diabetes, obesity & metabolism* 23: 489-98

King AJ. 2012. The use of animal models in diabetes research. *British journal of pharmacology* 166: 877-94

Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, et al. 2018. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature reviews. Endocrinology* 14: 140-62

Knopman DS, Jones DT, Greicius MD. 2021. Failure to demonstrate efficacy of aducanumab: An analysis of the EMERGE and ENGAGE trials as reported by Biogen, December 2019. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 17: 696-701

Knopman DS, Perlmutter JS. 2021. Prescribing Aducanumab in the Face of Meager Efficacy and Real Risks. *Neurology*

Koenig AM, Mechanic-Hamilton D, Xie SX, Combs MF, Cappola AR, et al. 2017. Effects of the Insulin Sensitizer Metformin in Alzheimer Disease: Pilot Data From a Randomized Placebo-controlled Crossover Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 31: 107-13

Kohjima M, Sun Y, Chan L. 2010. Increased food intake leads to obesity and insulin resistance in the tg2576 Alzheimer's disease mouse model. *Endocrinology* 151: 1532-40

Kolb H, Martin S. 2017. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC medicine* 15: 131

Kong FJ, Wu JH, Sun SY, Ma LL, Zhou JQ. 2018. Liraglutide ameliorates cognitive decline by promoting autophagy via the AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway in a streptozotocin-induced mouse model of diabetes. *Neuropharmacology* 131: 316-25

Kothari V, Galdo JA, Mathews ST. 2016. Hypoglycemic agents and potential anti-inflammatory activity. *Journal of inflammation research* 9: 27-38

Krall WJ, Sramek JJ, Cutler NR. 1999. Cholinesterase inhibitors: a therapeutic strategy for Alzheimer disease. *The Annals of pharmacotherapy* 33: 441-50

Kreilaus F, Masanetz R, Watt G, Przybyla M, Ittner A, et al. 2021. The behavioural phenotype of 14-month-old female TAU58/2 transgenic mice. *Behavioural brain research* 397: 112943

Kshirsagar V, Thingore C, Juvekar A. 2021. Insulin resistance: a connecting link between Alzheimer's disease and metabolic disorder. *Metabolic brain disease* 36: 67-83

Kulas JA, Franklin WF, Smith NA, Manocha GD, Puig KL, et al. 2019. Ablation of amyloid precursor protein increases insulin-degrading enzyme levels and activity in brain and peripheral tissues. 316: E106-E20

Kullmann S, Kleinridders A, Small DM, Fritsche A, Häring HU, et al. 2020. Central nervous pathways of insulin action in the control of metabolism and food intake. *The lancet. Diabetes & endocrinology* 8: 524-34

LaFerla FM, Green KN. 2012. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2

Lane CA, Hardy J, Schott JM. 2018. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 25: 59-70

Lascar N, Brown J, Pattison H, Barnett AH, Bailey CJ, Bellary S. 2018. Type 2 diabetes in adolescents and young adults. *The lancet. Diabetes & endocrinology* 6: 69-80

Lauretti E, Dincer O, Praticò D. 2020. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1867: 118664

Lawlor N, Khetan S, Ucar D, Stitzel ML. 2017. Genomics of Islet (Dys)function and Type 2 Diabetes. *Trends in genetics : TIG* 33: 244-55

Lee SJ, Nam E, Lee HJ, Savelieff MG, Lim MH. 2017. Towards an understanding of amyloid-β oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. *Chemical Society reviews* 46: 310-23

Li H, Wu J, Zhu L, Sha L, Yang S, et al. 2018. Insulin degrading enzyme contributes to the pathology in a mixed model of Type 2 diabetes and Alzheimer's disease: possible mechanisms of IDE in T2D and AD. *Biosci Rep* 38: BSR20170862

Li T, Jiao JJ, Su Q, Hölscher C, Zhang J, et al. 2020. A GLP-1/GIP/Gcg receptor triagonist improves memory behavior, as well as synaptic transmission, neuronal excitability and Ca(2+) homeostasis in 3xTg-AD mice. *Neuropharmacology* 170: 108042

Li Y, Duffy KB, Ottinger MA, Ray B, Bailey JA, et al. 2010. GLP-1 receptor stimulation reduces amyloid-beta peptide accumulation and cytotoxicity in cellular and animal models of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 19: 1205-19

Liang X, Wu H, Colt M, Guo X, Pluimer B, et al. 2021. Microglia and its genetics in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*

Lindström P. 2007. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *TheScientificWorldJournal* 7: 666-85

Liu CC, Zhao N, Fu Y, Wang N, Linares C, et al. 2017. ApoE4 Accelerates Early Seeding of Amyloid Pathology. *Neuron* 96: 1024-32.e3

Liu F, Tian N, Zhang HQ, Li SH, Zhou QZ, et al. 2020. GSK-3β activation accelerates early-stage consumption of Hippocampal Neurogenesis in senescent mice. *Theranostics* 10: 9674-85

Liu Y, Chen D, Smith A, Ye Q, Gao Y, Zhang W. 2021. Three-dimensional remodeling of functional cerebrovascular architecture and gliovascular unit in leptin receptor-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 41: 1547-62

Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. 2011. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *The Journal of pathology* 225: 54-62

Llorens-Martín M, Jurado J, Hernández F, Avila J. 2014. GSK-3β, a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Frontiers in molecular neuroscience* 7: 46

Long-Smith CM, Manning S, McClean PL, Coakley MF, O'Halloran DJ, et al. 2013. The Diabetes Drug Liraglutide Ameliorates Aberrant Insulin Receptor Localisation and Signalling in Parallel with Decreasing Both Amyloid-β Plaque and Glial Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *NeuroMolecular Medicine* 15: 102-14

Lopez OL, Kuller LH. 2019. Epidemiology of aging and associated cognitive disorders: Prevalence and incidence of Alzheimer's disease and other dementias. *Handbook of clinical neurology* 167: 139-48

Lubitz I, Haroutunian V, Katsel P, Leroith D, Landa N, et al. 2014. Non-viability of crossing the Alzheimer mouse model Tg2576 with the type 2 diabetes mouse model ob/ob. *Neurobiol Aging* 35: e19-20

Luchsinger JA, Perez T, Chang H, Mehta P, Steffener J, et al. 2016. Metformin in Amnestic Mild Cognitive Impairment: Results of a Pilot Randomized Placebo Controlled Clinical Trial. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 51: 501-14

Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. 2004. Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology* 63: 1187-92

Ly H, Despa F. 2019. Diabetes-related Amylin Dyshomeostasis: a Contributing Factor to Cerebrovascular Pathology and Dementia. *Journal of lipid and atherosclerosis* 8: 144-51

Lyu F, Wu D, Wei C, Wu A. 2020. Vascular cognitive impairment and dementia in type 2 diabetes mellitus: An overview. *Life sciences* 254: 117771

Ma DL, Chen FQ, Xu WJ, Yue WZ, Yuan G, Yang Y. 2015a. Early intervention with glucagon-like peptide 1 analog liraglutide prevents tau hyperphosphorylation in diabetic db/db mice. *Journal of neurochemistry* 135: 301-8

Ma M, Hasegawa Y, Koibuchi N, Toyama K, Uekawa K, et al. 2015b. DPP-4 inhibition with linagliptin ameliorates cognitive impairment and brain atrophy induced by transient cerebral ischemia in type 2 diabetic mice. *Cardiovascular Diabetology* 14: 54

Marino S, Bonanno L, Lo Buono V, Ciurleo R, Corallo F, et al. 2019. Longitudinal analysis of brain atrophy in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *The Journal of international medical research* 47: 5019-27

Martin-Timon I, Sevillano-Collantes C, Segura-Galindo A, Del Canizo-Gomez FJ. 2014. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength? *World J Diabetes* 5: 444-70

Maskery M, Goulding EM, Gengler S, Melchiorsen JU, Rosenkilde MM, Hölscher C. 2020. The Dual GLP-1/GIP Receptor Agonist DA4-JC Shows Superior Protective Properties Compared to the GLP-1 Analogue Liraglutide in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* 35: 1533317520953041

Masliah E, Sisk A, Mallory M, Games D. 2001. Neurofibrillary pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60: 357-68

Matsuzaki T, Sasaki K, Tanizaki Y, Hata J, Fujimi K, et al. 2010. Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the Hisayama study. *Neurology* 75: 764-70

McClean PL, Holscher C. 2014. Lixisenatide, a drug developed to treat type 2 diabetes, shows neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 86: 241-58

McClean PL, Hölscher C. 2014a. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 76 Pt A: 57-67

McClean PL, Hölscher C. 2014b. Lixisenatide, a drug developed to treat type 2 diabetes, shows neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 86: 241-58

McClean PL, Jalewa J, Hölscher C. 2015. Prophylactic liraglutide treatment prevents amyloid plaque deposition, chronic inflammation and memory impairment in APP/PS1 mice. *Behavioural brain research* 293: 96-106

McClean PL, Parthsarathy V, Faivre E, Hölscher C. 2011. The Diabetes Drug Liraglutide Prevents Degenerative Processes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. 31: 6587-94

Medina M, Avila J. 2013. Understanding the relationship between GSK-3 and Alzheimer's disease: a focus on how GSK-3 can modulate synaptic plasticity processes. *Expert review of neurotherapeutics* 13: 495-503

Mehan S, Bhalla S, Siddiqui EM, Sharma N, Shandilya A, Khan A. 2022. Potential Roles of Glucagon-Like Peptide-1 and Its Analogues in Dementia Targeting Impaired Insulin Secretion and Neurodegeneration. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* 12: 31-59

Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, et al. 2008. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451: 720-4

Millar P, Pathak N, Parthsarathy V, Bjourson AJ, O'Kane M, et al. 2017. Metabolic and neuroprotective effects of dapagliflozin and liraglutide in diabetic mice. *The Journal of endocrinology* 234: 255-67

Milner E, Zhou ML, Johnson AW, Vellimana AK, Greenberg JK, et al. 2014. Cerebral amyloid angiopathy increases susceptibility to infarction after focal cerebral ischemia in Tg2576 mice. *Stroke* 45: 3064-9

Mittal K, Katare DP. 2016. Shared links between type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease: A review. *Diabetes & metabolic syndrome* 10: S144-9

Moran C, Beare R, Wang W, Callisaya M, Srikanth V. 2019. Type 2 diabetes mellitus, brain atrophy, and cognitive decline. *Neurology* 92: e823-e30

Moran C, Phan TG, Chen J, Blizzard L, Beare R, et al. 2013. Brain atrophy in type 2 diabetes: regional distribution and influence on cognition. *Diabetes Care* 36: 4036-42

Moreth J, Mavoungou C, Schindowski K. 2013. Passive anti-amyloid immunotherapy in Alzheimer's disease: What are the most promising targets? *Immunity & ageing : I & A* 10: 18

Müller TD, Finan B, Bloom SR, D'Alessio D, Drucker DJ, et al. 2019. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Molecular metabolism* 30: 72-130

Mullins RJ, Mustapic M, Goetzl EJ, Kapogiannis D. 2017. Exosomal biomarkers of brain insulin resistance associated with regional atrophy in Alzheimer's disease. *Human brain mapping* 38: 1933-40

Muñoz-Jiménez M, Zaarkti A, García-Arnés JA, García-Casares N. 2020. Antidiabetic Drugs in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 49: 423-34

Nalivaeva NN, Belyaev ND, Kerridge C, Turner AJ. 2014. Amyloid-clearing proteins and their epigenetic regulation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience* 6: 235

Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, et al. 2012. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 71: 362-81

Nichols E, Vos T. 2021. The estimation of the global prevalence of dementia from 1990-2019 and forecasted prevalence through 2050: An analysis for the Global Burden of Disease (GBD) study 2019. 17: e051496

Niedowicz DM, Reeves VL, Platt TL, Kohler K, Beckett TL, et al. 2014. Obesity and diabetes cause cognitive dysfunction in the absence of accelerated β-amyloid deposition in a novel murine model of mixed or vascular dementia. *Acta neuropathologica communications* 2: 64

Nizynski B, Dzwolak W, Nieznanski K. 2017. Amyloidogenesis of Tau protein. *Protein Sci* 26: 2126-50

Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. 2003. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24: 1063-70

Ogama N, Sakurai T, Kawashima S, Tanikawa T, Tokuda H, et al. 2018. Postprandial Hyperglycemia Is Associated With White Matter Hyperintensity and Brain Atrophy in Older Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Frontiers in aging neuroscience* 10: 273-73

OMS. 2020. Demencia. Acceso: 21 de diciembre de 2021. Url: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia

OMS. 2021. Informe sobre la situación mundial de la respuesta de la salud pública a la demencia: resumen ejecutivo. Acceso: 21 de diciembre de 2021. Url: https://apps.who.int/iris/handle/10665/350993

Onyango IG, Jauregui GV, Čarná M, Bennett JP, Jr., Stokin GB. 2021. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Biomedicines* 9

Ott A, Stolk RP, Hofman A, van Harskamp F, Grobbee DE, Breteler MM. 1996. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia* 39: 1392-7

Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM. 1999. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 53: 1937-42

Pal K, Mukadam N, Petersen I, Cooper C. 2018. Mild cognitive impairment and progression to dementia in people with diabetes, prediabetes and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Social psychiatry and psychiatric epidemiology* 53: 1149-60

Paladugu L, Gharaibeh A, Kolli N, Learman C, Hall TC, et al. 2021. Liraglutide Has Anti-Inflammatory and Anti-Amyloid Properties in Streptozotocin-Induced and 5xFAD Mouse Models of Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences* 22

Palleria C, Leo A, Andreozzi F, Citraro R, Iannone M, et al. 2017. Liraglutide prevents cognitive decline in a rat model of streptozotocin-induced diabetes independently from its peripheral metabolic effects. *Behavioural brain research* 321: 157-69

Pandey S, Dvorakova MC. 2020. Future Perspective of Diabetic Animal Models. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 20: 25-38

Panza F, Lozupone M, Seripa D, Imbimbo BP. 2019. Amyloid-β immunotherapy for alzheimer disease: Is it now a long shot? *Annals of neurology* 85: 303-15

Park CR. 2001. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 25: 311-23

Park SH, Park JH, Shim HM, Na AY, Bae KC, et al. 2015. Protection of pancreatic β-cells against glucotoxicity by short-term treatment with GLP-1. *Biochemical and biophysical research communications* 459: 561-7

Parthsarathy V, Holscher C. 2013. Chronic treatment with the GLP1 analogue liraglutide increases cell proliferation and differentiation into neurons in an AD mouse model. *PLoS One* 8: e58784

Patterson CC, Karuranga S, Salpea P, Saeedi P, Dahlquist G, et al. 2019. Worldwide estimates of incidence, prevalence and mortality of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes research and clinical practice* 157: 107842

Paxinos G, Franklin KB. 2004. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Gulf Professional Publishing.

Peters KE, Davis WA, Taddei K, Martins RN, Masters CL, et al. 2017. Plasma Amyloid-β Peptides in Type 2 Diabetes: A Matched Case-Control Study. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 56: 1127-33

Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS. 2003. GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423: 435-9

Plaschke K, Kopitz J, Siegelin M, Schliebs R, Salkovic-Petrisic M, et al. 2010. Insulin-resistant brain state after intracerebroventricular streptozotocin injection exacerbates Alzheimer-like changes in Tg2576 AbetaPP-overexpressing mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 19: 691-704

Pöllänen PM, Ryhänen SJ, Toppari J, Ilonen J, Vähäsalo P, et al. 2020. Dynamics of Islet Autoantibodies During Prospective Follow-Up From Birth to Age 15 Years. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 105: e4638-51

Posner BI. 2017. Insulin Signalling: The Inside Story. *Canadian journal of diabetes* 41: 108-13

Prakash R, Johnson M, Fagan SC, Ergul A. 2013. Cerebral neovascularization and remodeling patterns in two different models of type 2 diabetes. *PloS one* 8: e56264

Preman P, Alfonso-Triguero M, Alberdi E, Verkhratsky A, Arranz AM. 2021. Astrocytes in Alzheimer's Disease: Pathological Significance and Molecular Pathways. *Cells* 10

Pruzin JJ, Schneider JA, Capuano AW, Leurgans SE, Barnes LL, et al. 2017. Diabetes, Hemoglobin A1C, and Regional Alzheimer Disease and Infarct Pathology. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 31: 41-47

Puzzo D, Gulisano W, Arancio O, Palmeri A. 2015. The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in Aβ physiology. *Neuroscience* 307: 26-36

Qi L, Chen Z, Wang Y, Liu X, Liu X, et al. 2017. Subcutaneous liraglutide ameliorates methylglyoxal-induced Alzheimer-like tau pathology and cognitive impairment by modulating tau hyperphosphorylation and glycogen synthase kinase-3β. In *Am J Transl Res*, pp. 247-60

Qi L, Ke L, Liu X, Liao L, Ke S, et al. 2016. Subcutaneous administration of liraglutide ameliorates learning and memory impairment by modulating tau hyperphosphorylation via the glycogen synthase kinase-3β pathway in an amyloid β protein induced alzheimer disease mouse model. *European Journal of Pharmacology* 783: 23-32

Ramos-Rodriguez JJ, Jimenez-Palomares M, Murillo-Carretero MI, Infante-Garcia C, Berrocoso E, et al. 2015. Central vascular disease and exacerbated pathology in a mixed model of type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology* 62: 69-79

Ramos-Rodriguez JJ, Ortiz O, Jimenez-Palomares M, Kay KR, Berrocoso E, et al. 2013. Differential central pathology and cognitive impairment in pre-diabetic and diabetic mice. *Psychoneuroendocrinology* 38: 2462-75

Ramos-Rodriguez JJ, Sanchez-Sotano D, Doblas-Marquez A, Infante-Garcia C, Lubian-Lopez S, Garcia-Alloza M. 2017a. Intranasal insulin reverts central pathology and cognitive impairment in diabetic mother offspring. *Mol Neurodegener* 12: 57

Ramos-Rodriguez JJ, Spires-Jones T, Pooler AM, Lechuga-Sancho AM, Bacskai BJ, Garcia-Alloza M. 2017b. Progressive Neuronal Pathology and Synaptic Loss Induced by Prediabetes and Type 2 Diabetes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 54: 3428-38

Ramos Rodriguez JJ, Infante Garcia C, Galindo-Gonzalez L, Garcia-Molina Y, Lechuga-Sancho A, Garcia-Alloza M. 2015. Increased Spontaneous Central Bleeding and Cognition Impairment in APP/PS1 Mice with Poorly Controlled Diabetes Mellitus. *Molecular neurobiology* 53

Ravipati K, Chen Y, Manns JR. 2022. Reassessing Diabetes and APOE Genotype as Potential Interacting Risk Factors for Alzheimer's Disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* 37: 15333175211070912

Reger MA, Watson GS, Frey WH, 2nd, Baker LD, Cholerton B, et al. 2006. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiol Aging* 27: 451-8

Reiman EM, Arboleda-Velasquez JF, Quiroz YT, Huentelman MJ, Beach TG, et al. 2020. Exceptionally low likelihood of Alzheimer's dementia in APOE2 homozygotes from a 5,000-person neuropathological study. *Nature communications* 11: 667

Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ. 2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* 348: 1333-41

Reiss AB, Arain HA, Stecker MM, Siegart NM, Kasselman LJ. 2018. Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Reviews in the neurosciences* 29: 613-27

Reitz C, Mayeux R. 2014. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical pharmacology* 88: 640-51

Robinson A, Lubitz I, Atrakchi-Baranes D, Licht-Murava A, Katsel P, et al. 2019. Combination of Insulin with a GLP1 Agonist Is Associated with Better Memory and Normal Expression of Insulin Receptor Pathway Genes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of molecular neuroscience : MN* 67: 504-10

Rockenstein EM, McConlogue L, Tan H, Power M, Masliah E, Mucke L. 1995. Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry* 270: 28257-67

Rojo-Martínez G, Valdés S, Soriguer F, Vendrell J, Urrutia I, et al. 2020. Incidence of diabetes mellitus in Spain as results of the nation-wide cohort di@bet.es study. *Scientific Reports* 10: 2765

Ruiz HH, Chi T, Shin AC, Lindtner C, Hsieh W, et al. 2016. Increased susceptibility to metabolic dysregulation in a mouse model of Alzheimer's disease is associated with impaired hypothalamic insulin signaling and elevated BCAA levels. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 12: 851-61

Ryu JC, Zimmer ER, Rosa-Neto P, Yoon SO. 2019. Consequences of Metabolic Disruption in Alzheimer's Disease Pathology. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 16: 600-10

Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N. 2019. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the . Diabetes Res Clin Pract.

Sah SK, Lee C, Jang JH, Park GH. 2017. Effect of high-fat diet on cognitive impairment in triple-transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications* 493: 731-36

Salcedo I, Tweedie D, Li Y, Greig NH. 2012. Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: an emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders. *British journal of pharmacology* 166: 1586-99

Salles GN, Calió ML, Afewerki S, Pacheco-Soares C, Porcionatto M, et al. 2018. Prolonged Drug-Releasing Fibers Attenuate Alzheimer's Disease-like Pathogenesis. *ACS applied materials & interfaces* 10: 36693-702

Salles GN, Calió ML, Hölscher C, Pacheco-Soares C, Porcionatto M, Lobo AO. 2020. Neuroprotective and restorative properties of the GLP-1/GIP dual agonist DA-JC1 compared with a GLP-1 single agonist in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 162: 107813

Salloway S, Cummings J. 2021. Aducanumab, Amyloid Lowering, and Slowing of Alzheimer Disease. *Neurology* 97: 543-44

Samaras K, Makkar S, Crawford JD, Kochan NA, Wen W, et al. 2020. Metformin Use Is Associated With Slowed Cognitive Decline and Reduced Incident Dementia in Older Adults With Type 2 Diabetes: The Sydney Memory and Ageing Study. *Diabetes Care* 43: 2691-701

Sankar SB, Infante-Garcia C, Weinstock LD, Ramos-Rodriguez JJ, Hierro-Bujalance C, et al. 2020. Amyloid beta and diabetic pathology cooperatively stimulate cytokine expression in an Alzheimer's mouse model. *Journal of neuroinflammation* 17: 38

Sato N, Takeda S, Uchio-Yamada K, Ueda H, Fujisawa T, et al. 2011. Role of insulin signaling in the interaction between Alzheimer disease and diabetes mellitus: a missing link to therapeutic potential. *Current aging science* 4: 118-27

Sayas CL, Ávila J. 2021. GSK-3 and Tau: A Key Duet in Alzheimer's Disease. *Cells* 10

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, et al. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400: 173-7

Schrijvers EM, Witteman JC, Sijbrands EJ, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. 2010. Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease: the Rotterdam Study. *Neurology* 75: 1982-7

Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, 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: 3100-5

Sengoku R. 2020. Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 40: 22-29

Seo JH, Ahn Y, Lee SR, Yeol Yeo C, Chung Hur K. 2005. The major target of the endogenously generated reactive oxygen species in response to insulin stimulation is phosphatase and tensin homolog and not phosphoinositide-3 kinase (PI-3 kinase) in the PI-3 kinase/Akt pathway. *Mol Biol Cell* 16: 348-57

Serrano-Pozo A, Das S, Hyman BT. 2021. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *The Lancet. Neurology* 20: 68-80

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 1: a006189

Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, et al. 2016. The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 537: 50-56

Song S, Guo R, Mehmood A, Zhang L, Yin B, et al. 2022. Liraglutide attenuate central nervous inflammation and demyelination through AMPK and pyroptosis-related NLRP3 pathway. *CNS neuroscience & therapeutics* 28: 422-34

Sørgjerd EP. 2019. Type 1 Diabetes-related Autoantibodies in Different Forms of Diabetes. *Current diabetes reviews* 15: 199-204

Soutar MP, Kim WY, Williamson R, Peggie M, Hastie CJ, et al. 2010. Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain. *Journal of neurochemistry* 115: 974-83

Stern EA, Bacskai BJ, Hickey GA, Attenello FJ, Lombardo JA, Hyman BT. 2004. Cortical synaptic integration in vivo is disrupted by amyloid-beta plaques. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 4535-40

Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, Kashani F, et al. 2017. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox biology* 13: 370-85

Stoeckel LE, Arvanitakis Z, Gandy S, Small D, Kahn CR, et al. 2016. Complex mechanisms linking neurocognitive dysfunction to insulin resistance and other metabolic dysfunction. *F1000Res* 5: 353-53

Strobel G. 2021. What Is Early Onset Familial Alzheimer Disease (eFAD)? Acceso: Url: https://www.alzforum.org/early-onset-familial-ad/overview/what-early-onset-familial-alzheimer-disease-efad

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, et al. 1997. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 13287-92

Sugizaki T, Zhu S, Guo G, Matsumoto A, Zhao J, et al. 2017. Treatment of diabetic mice with the SGLT2 inhibitor TA-1887 antagonizes diabetic cachexia and decreases mortality. *NPJ aging and mechanisms of disease* 3: 12

Sun J, Roy S. 2018. The physical approximation of APP and BACE-1: A key event in alzheimer's disease pathogenesis. *Developmental neurobiology* 78: 340-47

Sun Y, Ma C, Sun H, Wang H, Peng W, et al. 2020. Metabolism: A Novel Shared Link between Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease. *Journal of diabetes research* 2020: 4981814-14

Tai J, Liu W, Li Y, Li L, Hölscher C. 2018. Neuroprotective effects of a triple GLP-1/GIP/glucagon receptor agonist in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain research* 1678: 64-74

Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, et al. 2010. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 7036-41

Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, 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: 1316-38

Tan SY, Mei Wong JL, Sim YJ, Wong SS, Mohamed Elhassan SA, et al. 2019. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes & metabolic syndrome* 13: 364-72

Tariot PN, Solomon P, Morris J, Kershaw P, Lilienfeld S, et al. 2000. A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. 54: 2269-76

Tian H, Ding N, Guo M, Wang S, Wang Z, et al. 2019. Analysis of Learning and Memory Ability in an Alzheimer's Disease Mouse Model using the Morris Water Maze. *Journal of visualized experiments : JoVE*

Timper K, Del Río-Martín A, Cremer AL, Bremser S, Alber J, et al. 2020. GLP-1 Receptor Signaling in Astrocytes Regulates Fatty Acid Oxidation, Mitochondrial Integrity, and Function. *Cell metabolism* 31: 1189-205.e13

Tolppanen AM, Ngandu T, Kåreholt I, Laatikainen T, Rusanen M, et al. 2014. Midlife and late-life body mass index and late-life dementia: results from a prospective population-based cohort. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 38: 201-9

Tong JQ, Zhang J, Hao M, Yang J, Han YF, et al. 2015. Leptin attenuates the detrimental effects of beta-amyloid on spatial memory and hippocampal later-phase long term potentiation in rats. *Hormones and behavior* 73: 125-30

Tracy TE, Gan L. 2018. Tau-mediated synaptic and neuronal dysfunction in neurodegenerative disease. *Current opinion in neurobiology* 51: 134-38

Tumminia A, Vinciguerra F, Parisi M, Frittitta L. 2018. Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: Role of Insulin Signalling and Therapeutic Implications. *International journal of molecular sciences* 19

Ulrich JD, Ulland TK, Colonna M, Holtzman DM. 2017. Elucidating the Role of TREM2 in Alzheimer's Disease. *Neuron* 94: 237-48

US_Food_&_Drug_Administration. 2021. DA grants accelerated approval for Alzheimer’s drug. Acceso: 7 junio. Url: https://www.fda.gov/

Vadini F, Simeone PG, Boccatonda A, Guagnano MT, Liani R, et al. 2020. Liraglutide improves memory in obese patients with prediabetes or early type 2 diabetes: a randomized, controlled study. *International Journal of Obesity* 44: 1254-63

Valenza S, Paciaroni L, Paolini S, Bonfigli AR, Di Rosa M, et al. 2020. Mild Cognitive Impairment Subtypes and Type 2 Diabetes in Elderly Subjects. *J Clin Med* 9

van Sloten TT, Sedaghat S, Carnethon MR, Launer LJ, Stehouwer CDA. 2020. Cerebral microvascular complications of type 2 diabetes: stroke, cognitive dysfunction, and depression. *The lancet. Diabetes & endocrinology* 8: 325-36

Vargas-Soria M, Carranza-Naval MJ, Del Marco A, Garcia-Alloza M. 2021. Role of liraglutide in Alzheimer's disease pathology. *Alzheimer's research & therapy* 13: 112

Vieira MNN, Lima-Filho RAS, De Felice FG. 2017. Connecting Alzheimer's disease to diabetes: Underlying mechanisms and potential therapeutic targets. *Neuropharmacology*

Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. 2014. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Current diabetes reviews* 10: 131-45

Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, Song W, Tzaferis JA, et al. 2016. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *The Journal of experimental medicine* 213: 667-75

Watson GS, Cholerton BA, Reger MA, Baker LD, Plymate SR, 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: 950-8

Watson KT, Wroolie TE, Tong G, Foland-Ross LC, Frangou S, et al. 2019. Neural correlates of liraglutide effects in persons at risk for Alzheimer's disease. *Behavioural brain research* 356: 271-78

Wegmann S, Maury EA, Kirk MJ, Saqran L, Roe A, et al. 2015. Removing endogenous tau does not prevent tau propagation yet reduces its neurotoxicity. *The EMBO journal* 34: 3028-41

Wei Z, Koya J, Reznik SE. 2021. Insulin Resistance Exacerbates Alzheimer Disease via Multiple Mechanisms. 15

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 1858-62

Wiciński M, Socha M, Malinowski B, Wódkiewicz E, Walczak M, et al. 2019. Liraglutide and its Neuroprotective Properties-Focus on Possible Biochemical Mechanisms in Alzheimer's Disease and Cerebral Ischemic Events. *International journal of molecular sciences* 20

Winblad B, Grossberg G, Frölich L, Farlow M, Zechner S, et al. 2007. IDEAL: a 6-month, double-blind, placebo-controlled study of the first skin patch for Alzheimer disease. 69: S14-S22

Winkler DT, Bondolfi L, Herzig MC, Jann L, Calhoun ME, et al. 2001. Spontaneous hemorrhagic stroke in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21: 1619-27

Wong SK, Chin K-Y, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. 2016. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)* 13: 65-65

Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. 2014. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *International journal of medical sciences* 11: 1185-200

Xie Y, Zheng J, Li S, Li H, Zhou Y, et al. 2021. GLP-1 improves the neuronal supportive ability of astrocytes in Alzheimer's disease by regulating mitochondrial dysfunction via the cAMP/PKA pathway. *Biochemical pharmacology* 188: 114578

Yan W, Pang M, Yu Y, Gou X, Si P, et al. 2019. The neuroprotection of liraglutide on diabetic cognitive deficits is associated with improved hippocampal synapses and inhibited neuronal apoptosis. *Life sciences* 231: 116566

Yang P, Sun F. 2021. Aducanumab: The first targeted Alzheimer's therapy. *Drug discoveries & therapeutics* 15: 166-68

Yang Y, Zhang J, Ma D, Zhang M, Hu S, et al. 2013. Subcutaneous administration of liraglutide ameliorates Alzheimer-associated tau hyperphosphorylation in rats with type 2 diabetes. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 37: 637-48

Yook JS, Rakwal R, Shibato J, Takahashi K, Koizumi H, et al. 2019. Leptin in hippocampus mediates benefits of mild exercise by an antioxidant on neurogenesis and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 10988-93

Yuan Z, Li D, Feng P, Xue G, Ji C, et al. 2017. A novel GLP-1/GIP dual agonist is more effective than liraglutide in reducing inflammation and enhancing GDNF release in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* 812: 82-90

Yun JS, Ko SH. 2021. Current trends in epidemiology of cardiovascular disease and cardiovascular risk management in type 2 diabetes. *Metabolism: clinical and experimental* 123: 154838

Zhang F, Zhong RJ, Cheng C, Li S, Le WD. 2021. New therapeutics beyond amyloid-β and tau for the treatment of Alzheimer's disease. *Acta pharmacologica Sinica* 42: 1382-89

Zhang J, Chen C, Hua S, Liao H, Wang M, et al. 2017. An updated meta-analysis of cohort studies: Diabetes and risk of Alzheimer's disease. *Diabetes research and clinical practice* 124: 41-47

Zhang L, Chen C, Mak MS, Lu J, Wu Z, et al. 2020. Advance of sporadic Alzheimer's disease animal models. 40: 431-58

Zhang W, Lu J, Qing Z, Zhang X, Zhao H, et al. 2022. Effects of Subcortical Atrophy and Alzheimer's Pathology on Cognition in Elderly Type 2 Diabetes: The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative Study. *Frontiers in aging neuroscience* 14: 781938-38

Zhang Y, Huang NQ, Yan F, Jin H, Zhou SY, et al. 2018. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: GSK-3β as a potential link. *Behavioural brain research* 339: 57-65

Zhang Y, Xie J-Z, Xu X-Y, Hu J, Xu T, et al. 2019. Liraglutide Ameliorates Hyperhomocysteinemia-Induced Alzheimer-Like Pathology and Memory Deficits in Rats via Multi-molecular Targeting. *Neuroscience bulletin* 35: 724-34

Zhao M, Jiang XF, Zhang HQ, Sun JH, Pei H, et al. 2021. Interactions between glial cells and the blood-brain barrier and their role in Alzheimer's disease. *Ageing research reviews* 72: 101483

Zhao WQ, Alkon DL. 2001. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Molecular and cellular endocrinology* 177: 125-34

Zheng J, Xie Y, Ren L, Qi L, Wu L, et al. 2021. GLP-1 improves the supportive ability of astrocytes to neurons by promoting aerobic glycolysis in Alzheimer's disease. *Molecular metabolism* 47: 101180

Zheng M, Wang P. 2021. Role of insulin receptor substance-1 modulating PI3K/Akt insulin signaling pathway in Alzheimer's disease. *3 Biotech* 11: 179

Zheng Y, Ley SH, Hu FB. 2018. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature reviews. Endocrinology* 14: 88-98

Zhou SL, Tan CC, Hou XH, Cao XP, Tan L, Yu JT. 2019. TREM2 Variants and Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 68: 1171-84

Zhu XC, Tan L, Wang HF, Jiang T, Cao L, et al. 2015. Rate of early onset Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Annals of translational medicine* 3: 38

XI. AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mónica García Alloza, por permitirme realizar esta tesis doctoral en su grupo. Gracias por enseñarme y acompañarme hasta la culminación de este trabajo, que sin tu compromiso y tenacidad no hubiera sido posible.

Gracias a mis compañeros de laboratorio. Al Dr. Ángel del Marco, por su cariño y trabajo, por las horas delante del microscopio, las horas de incubaciones, sus correcciones, gracias por tu amabilidad y tu entrega en este proyecto. A la Dra. Carmen Infante, con quien pude compartir poco tiempo entre pipetas, pero fue suficiente para que me transmitiera la pasión por la ciencia, una persona que contagia alegría, buen ambiente, gracias por tus consejos, por tu estar siempre, fuese tarde o el mes de agosto, que suerte que "el laboratorio" nos juntase para que ahora sigamos disfrutando de nuestra amistad. A la Dra. Carmen Hierro, con quien comencé este camino y la que ha estado en todo momento a mi lado, incluso cuando ella pensaba que no. La que me ha enseñado minuciosamente y con cariño tantas técnicas. Nunca olvidaremos el día que nos conocimos, los momentos de animalario, nuestras confidencias, alguna que otra lágrima y las alegrías compartidas durante este tiempo. Has sido y eres para mí un ejemplo, una persona maravillosa. Gracias amiga, sin ti, esta tesis no hubiera sido posible. A Pilar Alves, quien llegó tímidamente al laboratorio y ahora lo ha revolucionado, con su alegría y su espontaneidad, gracias por tu sonrisa, tus anécdotas, tu trabajo, por enseñarme y tener paciencia conmigo, una suerte habernos encontrado amiga. A María Vargas, por haber compartido y confiado tanto a mi persona, gracias por estar a mi lado en este tiempo, gracias por tu empatía. A Isa Atienza, con quien trabajé poco tiempo en el laboratorio, pero a la que agradezco su ánimo en esta última etapa. A Marta Herrera, por tus aportaciones y tu buen hacer con este trabajo de tesis, por el tiempo compartido en el laboratorio, gracias por todo. A Belén Barba, que finalizó su etapa como estudiante de medicina trabajando en esta tesis, gracias por tu apoyo y tu contribución al trabajo, por tu interés y tu eterna sonrisa. A Ana, gran compañera, gracias por tu ayuda y apoyo.

A la Dra. Carmen Castro por tu interés por esta tesis, tus consejos y explicaciones de algunas técnicas fueron importantes para el desarrollo de las mismas y la consecución de este documento, gracias. Al equipo de la Dra. Castro con quien he tenido la suerte de compartir despacho y laboratorio, con todo lo que eso implica. Gracias a la Dra. Noelia Geribaldi, por tu ejemplo y tu tesón, tu capacidad de trabajo y tus consejos, eres una

gran trabajadora y mejor persona. Al Dr. Samuel Domínguez, con quien he compartido tantas conversaciones y horas de laboratorio, gracias por tus explicaciones y consejos, por esa tímida sonrisa. A Ricardo, trabajador, entusiasta y buena persona, gracias por tus ratos frente al microscopio y tu apoyo. A los Dr. Enrique Aguado y Dr. Francisco García, por vuestros ánimos y consejos.

A Lucía, Miquel y Juanpe, compañeros de pasillo, gracias por estar siempre para todo lo que me ha hecho falta, no os han importado ni las horas ni los días de vacaciones.

Gracias a los trabajadores de Servicios Centrales: Fernando, Chelo, Emilio y Miki, por vuestro trabajo y amabilidad.

Gracias al Dr. Carlos Costela y a los trabajadores del animalario: José Ramón, Antonia, Rubén y Luismi, por vuestra ayuda, apoyo y alegría.

Esta etapa no hubiera sido posible sin el apoyo de mi equipo de Salus Infirmorum. Gracias a todos los compañeros: Dra. Conchi Mata, Dr. Alberto Cruz, Dr. José Luís Palazón, Dr. José de la Fuente, Daniel Román, Inma Quiñones, Teresa Gómez y José Luís Díaz. Muy especialmente agradecer a Mercedes Herrera, que siempre me ha hecho fácil el trabajo, por tu firmeza y rigor. A María Jesús Vidal, que me alentó a no rendirme y me ayudó siempre a ver lo positivo de esta etapa. A María del Mar, quien ha hecho mi labor mucho más fácil, siempre atenta y disponible, gracias por ser tan buena persona. A Nacho, por ser tan servicial y estar ahí para lo que me ha hecho falta, por tu capacidad de hacer sonreír. A Dra. Eva Cotobal, con quien he compartido la última etapa y de quien siempre he tenido el apoyo y el cariño. A la Dra. Carmen Romero, por tu apoyo y ánimo, gracias por estar. A la Dra. Anna Bochinno, por tu escucha y tu empatía, por tu claridad y sinceridad, gracias por tener siempre un buen consejo para mí. A Belén Gutiérrez, mi pack, con quien comparto pasión (la enfermería y la docencia), gracias por hacerme más fácil el trabajo, por nuestros cafés (en taza siempre), por tu perseverancia, por tu sonrisa y tu abrazo desinteresado. Eres un gran descubrimiento para mí, gracias por tu amistad. A mis compañeros de despacho: la Dra. Mónica Schwarz, de la que nunca me ha faltado una palabra de ánimo y buenos consejos. Al Dr. Francisco Glicerio, que me ha escuchado y aconsejado cariñosa y amablemente. Al Dr. Francisco Medina, por tus muestras de afecto, cariño y ánimo. A la Dra. Carmen Segundo, con la que he tenido tantas

conversaciones y confidencias y algún rato en el laboratorio, que suerte compartir mi día a día con una persona tan generosa y humilde, gracias por tus consejos.

Gracias al equipo directivo de Salus Infirmorum. Al coordinador, el Dr. Juan Carlos Paramio, quien ha estado siempre, me ha apoyado y escuchado, gracias por tu ánimo y paciencia conmigo. Al secretario, Ángel Martínez, una persona excelente, gracias por atender a tantos alumnos que me buscaban en mis ausencias, por cubrirme siempre que ha sido necesario, por tu apoyo y tu estar siempre. Y gracias especialmente a dos personas fundamentales, la directora, la Dra. Isabel Lepiani, por tu paciencia y ánimo, por confiar y apostar por mí, gracias por escucharme y alentarme, por compartir proyectos y sueños. Trabajar contigo es un privilegio, gracias amiga; y la presidenta, Concha Mejías, quien me enseñó a cuidar, quien me cuida y aconseja. Mi jefa, con todo lo que eso significa para nosotros, una referente en lo profesional y en lo personal. Gracias por tanto bueno, no tendré vida para agradecerte lo que has hecho y sigues haciendo por mí; gracias por hacerme formar parte de un proyecto tan apasionante, tan humano y tan de Dios como Salus Infirmorum.

Además, por mi vida profesional han pasado otras personas a las que quiero agradecer, principalmente a la Dra. María Jesús Medialdea, su humildad y buenos consejos, sin ti esta etapa enriquecedora no hubiera sido posible. Gracias por estar siempre, por tu confianza, tu entrega, por todo lo que me enseñas, sabes lo importante y especial que eres para mí. Y a la Dra. María Dueñas, por tu apoyo e interés en este proyecto.

Sin duda, gracias a tantos alumnos que en estos años han pasado por las aulas y que ahora son compañeros de profesión, gracias por vuestro apoyo y ánimo: María A., Patri, Tamara, Laura, María M., Gema, Estefanía, Lucía, Cristina, Sara, Alfonso, Javi, Julia, Paola… gracias.

A mis directores en el hospital: al Dr. Antonio Amaya, por tu confianza y ejemplo. A Mar Ramos y José Gago, por vuestra disponibilidad y comprensión, por haberme brindado la oportunidad de volver a ejercer la enfermería. A todos mis compañeros enfermeros, que me apoyaron, me cambiaron turnos y me animaron a no rendirme: Laura M., Cristina, Eli, Irma, Rocío, Maca, María Jesús, Inma, Ana, Alba, Tere, Geno, Rafa, Mila… gracias. Y a mis pacientes, quienes me hacen recordar lo importante de la vida, que es

simplemente vivirla, a vosotros los que estáis luchando y los que dejaron huella: Verónica, Mila, María, Carmen, José, Ana… gracias.

Me gustaría agradecer a mis amigos, que me acompañaron durante esta y otras aventuras. A Laurita, con quien entré por primera vez en un laboratorio y me enseñó de la rigurosidad del trabajo, gracias amiga por estar siempre, lo que más vale en el mundo no se compra con dinero. A Mar, a la que me unió una mesa en clase y algún que otro trabajo, por revolucionar mi vida, por ser tan maravillosa, gracias por tanto. A Sandra, por tu confianza, serenidad y apoyo. A Gloria, por estar cuando más la he necesitado. A Irene, por tu bondad y tu alegría, por ser incondicional. A Chari, por tener siempre una palabra de ánimo, por tu confianza y cariño. A Noemí y Rosa, por vuestra amistad y alegría, quien mejor que vosotras para sacarme una sonrisa. A Marina, por ser y estar, por lo compartido y lo vivido, contigo la vida es mejor, gracias amiga. A Laura, mi acompañante, por acompasar mi vida, por ayudarme y cuidarme tanto, gracias por ser instrumento. A Eloísa, Elo, Quique, Javier y Julio, familia que la vida te regala, personas con un corazón enorme, y quienes han estado presentes en los momentos más importantes de mi vida y me han apoyado con cariño en esta etapa, gracias.

A todos los familiares que estuvieron a mi lado haciendo más llevadero este trabajo: Agustín, Rosi, Rosamari, Agu, David, Javier, Javi, José, Inma, Manoli, Rebeca.

A mis titas Pepi y Rosario, a mi tito José Antonio y a mis primos (Rafael, Carlos, José Andrés, Paula, Esther y Ana V.), por estar siempre atentos, animarme y compartir esta etapa.

A ti Antonio, con quien he tenido la dicha de cruzarme en el camino. Gracias por haber compartido conmigo esta aventura, por tu apoyo incondicional, tu sosiego, tu alegría y tu magia. Gracias por hacerlo todo nuevo.

A mis abuelos, quienes me mostraron tantos valores, la importancia del trabajo bien hecho, la necesidad de la perseverancia y el tesón, este trabajo es la consecución de lo que vosotros me enseñasteis.

A mi hermano Servando y mi cuñada Julia, quienes han hecho más fácil esta etapa con sus visitas, llamadas y mensajes, y a mis sobrinos Servando y Hugo, por sentaros conmigo a cuantificar y escribir cada vez que hemos estado juntos. Gracias por hacerme sentir la persona más afortunada del mundo por teneros, por el abrazo que soluciona todos los problemas.

Y a mis padres, Servando y Rosario, nadie mejor que vosotros conoce mis desvelos y mis sueños. Muchas gracias por la educación que me habéis dado, en la que siempre ha primado el respeto, la humildad y la honradez. Gracias por ser incansables, por estar a mi lado y por ser siempre los brazos a los que volver pase lo que pase. Este trabajo es fruto de vuestro esfuerzo y va dedicado a vosotros, el mejor regalo que me ha dado la vida. Os quiero con locura.

Gracias.

A Él por Ella, siempre.

XII. ANEXOS

ANEXO 1. PUBLICACIONES ORIGINALES INCLUIDAS EN EL TRABAJO

1.- **Carranza-Naval MJ.**, del Marco A., Hierro-Bujalance C., Alves-Martinez P., Infante-Garcia C., Vargas-Soria M., Herrera M., Barba-Cordoba B., Atienza-Navarro I., Lubian-Lopez S., Garcia-Alloza M. Liraglutide Reduces Vascular Damage, Neuronal Loss, and Cognitive Impairment in a Mixed Murine Model of Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. Front Aging Neurosci. 2021 Dec 16;13:741923. doi: 10.3389/fnagi.2021.741923. ***FI. 5.750***

2.- Vargas-Soria M.*, **Carranza-Naval MJ.***, del Marco A., Garcia-Alloza M. Role of liraglutide in Alzheimer's disease pathology. Alzheimers Res Ther. 2021 Jun 12;13(1):112. doi: 10.1186/s13195-021-00853-0. **igual contribución.* ***FI. 6.28***

frontiers in Aging Neuroscience

ORIGINAL RESEARCH
published: 16 December 2021
doi: 10.3389/fnagi.2021.741923

Liraglutide Reduces Vascular Damage, Neuronal Loss, and Cognitive Impairment in a Mixed Murine Model of Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes

*Maria Jose Carranza-Naval[1,2,3], Angel del Marco[1,2], Carmen Hierro-Bujalance[1,2], Pilar Alves-Martinez[1,2], Carmen Infante-Garcia[1,2], Maria Vargas-Soria[1,2], Marta Herrera[1], Belen Barba-Cordoba[1], Isabel Atienza-Navarro[1,2], Simon Lubian-Lopez[2,4] and Monica Garcia-Alloza[1,2]**

[1] Division of Physiology, School of Medicine, Universidad de Cádiz, Cádiz, Spain, [2] Instituto de Investigacion e Innovacion en Ciencias Biomedicas de la Provincia de Cádiz (INIBICA), Cádiz, Spain, [3] Salus Infirmorum-Universidad de Cádiz, Cádiz, Spain, [4] Section of Neonatology, Division of Pediatrics, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:
Changning Wang,
Harvard Medical School,
United States

Reviewed by:
Marcos Jair Guerrero-Munoz,
Autonomous University of Nuevo León, Mexico
Paula L. McClean,
Ulster University, United Kingdom

***Correspondence:**
Monica Garcia-Alloza
monica.garcia@uca.es

Specialty section:
This article was submitted to Alzheimer's Disease and Related Dementias, a section of the journal Frontiers in Aging Neuroscience

Received: 15 July 2021
Accepted: 20 October 2021
Published: 16 December 2021

Citation:
Carranza-Naval MJ, del Marco A, Hierro-Bujalance C, Alves-Martinez P, Infante-Garcia C, Vargas-Soria M, Herrera M, Barba-Cordoba B, Atienza-Navarro I, Lubian-Lopez S and Garcia-Alloza M (2021) Liraglutide Reduces Vascular Damage, Neuronal Loss, and Cognitive Impairment in a Mixed Murine Model of Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. Front. Aging Neurosci. 13:741923. doi: 10.3389/fnagi.2021.741923

Alzheimer's disease is the most common form of dementia, and epidemiological studies support that type 2 diabetes (T2D) is a major contributor. The relationship between both diseases and the fact that Alzheimer's disease (AD) does not have a successful treatment support the study on antidiabetic drugs limiting or slowing down brain complications in AD. Among these, liraglutide (LRGT), a glucagon-like peptide-1 agonist, is currently being tested in patients with AD in the Evaluating Liraglutide in Alzheimer's Disease (ELAD) clinical trial. However, the effects of LRGT on brain pathology when AD and T2D coexist have not been assessed. We have administered LRGT (500 μg/kg/day) to a mixed murine model of AD and T2D (APP/PS1xdb/db mice) for 20 weeks. We have evaluated metabolic parameters as well as the effects of LRGT on learning and memory. *Postmortem* analysis included assessment of brain amyloid-β and tau pathologies, microglia activation, spontaneous bleeding and neuronal loss, as well as insulin and insulin-like growth factor 1 receptors. LRGT treatment reduced glucose levels in diabetic mice (db/db and APP/PS1xdb/db) after 4 weeks of treatment. LRGT also helped to maintain insulin levels after 8 weeks of treatment. While we did not detect any effects on cortical insulin or insulin-like growth factor 1 receptor m-RNA levels, LRGT significantly reduced brain atrophy in the db/db and APP/PS1xdb/db mice. LRGT treatment also rescued neuron density in the APP/PS1xdb/db mice in the proximity ($p = 0.008$) far from amyloid plaques ($p < 0.001$). LRGT reduced amyloid plaque burden in the APP/PS1 animals ($p < 0.001$), as well as Aβ aggregates levels ($p = 0.046$), and tau hyperphosphorylation ($p = 0.009$) in the APP/PS1xdb/db mice. Spontaneous bleeding was also ameliorated in the APP/PS1xdb/db animals ($p = 0.012$), and microglia burden was reduced in the proximity of amyloid plaques in the APP/PS1 and APP/PS1xdb/db mice ($p < 0.001$), while microglia was reduced in areas far from amyloid plaques in the db/db and APP/PS1xdb/db mice ($p < 0.001$). This overall improvement helped

to rescue cognitive impairment in AD-T2D mice in the new object discrimination test ($p < 0.001$) and Morris water maze ($p < 0.001$). Altogether, our data support the role of LRGT in reduction of associated brain complications when T2D and AD occur simultaneously, as regularly observed in the clinical arena.

Keywords: Alzheimer's disease, type 2 diabetes, liraglutide, neuronal loss, hemorrhage, inflammation

INTRODUCTION

Age remains the main risk factor for Alzheimer's disease (AD). Nevertheless, metabolic disorders, and type 2 diabetes (T2D) specifically, may also increase the risk of AD by over twofolds (Sims-Robinson et al., 2010; Ryu et al., 2019). Likewise, the close relationship between AD and T2D has been long analyzed (Biessels and Despa, 2018; Vieira et al., 2018). Studies on animal models have shown that metabolic alterations may affect different amyloid species and amyloid deposition, although the effects seem to be highly dependent on the specific animal model used (Ramos-Rodriguez et al., 2014; Wang et al., 2014; Chatterjee and Mudher, 2018; Natunen et al., 2020). On the other hand, while it is widely accepted that cognitive dysfunction is an important and common comorbidity of diabetes, this effect does not seem to be directly related to alterations in amyloid pathology, and previous studies have reported no differences in cerebrospinal fluid amyloid-β (Aβ)-42 levels, global or regional AD pathology, or amyloid burden (Arvanitakis et al., 2006; Moran et al., 2015; Pruzin et al., 2017; Biessels and Despa, 2018). Interestingly, a recent study using PET with ^{18}F-Florbetaben for global Aβ standardized value uptake ratio shows that prediabetes, but not T2D, is associated with higher Aβ levels (Luchsinger et al., 2020), supporting further studies on the effects of metabolic disorders and T2D treatments at this level. It has also been suggested that the inconsistent findings relating T2D to AD pathology might be due to the inclusion of heterogeneous diabetic populations and not accounting for glycemic control. In this sense, individuals with undiagnosed diabetes have increased risk of dementia when compared with individuals with well-managed diabetes and without diabetes (McIntosh et al., 2019). In any case, T2D is a risk factor for AD even after adjusting for vascular risk factors (Wang et al., 2012; Huang et al., 2014). Even if only 10% of diabetic patients end up suffering AD later in life, the number of patients with AD in the world will double (Ryu et al., 2019). Additionally, patients with AD have an increased risk of T2D, and up to 81% of patients with AD have T2D or impaired fasting glucose (Janson et al., 2004), supporting a two-way cross-talk between both pathologies.

Previous studies have shown that multiple players may underline the crosstalk between AD and T2D (Sims-Robinson et al., 2010; Ramos-Rodriguez et al., 2015; Infante-Garcia et al., 2016; Salas and De Strooper, 2019). Animal models have shown that metabolic alterations may affect and accelerate AD pathological features, ultimately contributing to cognitive impairment (Takeda et al., 2010; Ramos-Rodriguez et al., 2015; Infante-Garcia et al., 2016). In line with these observations, an ongoing project (Retinal and Cognitive Dysfunction in Type 2 Diabetes, recognized, Clinical Trials gov registration no. NCT04281186) funded by the European Commission (H2020 program-GA 847749) is currently investigating common mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy and cognitive impairment in the T2D population. Moreover, since AD has no successful treatment and brain insulin resistance may be significantly affected; clinical trials on insulin have been carried out. Regular insulin improves cognition in patients with mild cognitive impairment or mild to moderate AD, and is accompanied by improvements in tau-P181/Aβ42 ratio and specific brain volumes on MRI (Craft et al., 2017). Similarly, promising outcomes have been observed after intranasal insulin administration, such as preserved general cognition. Exploratory analyses revealed that changes in memory and function were associated to Aβ42 levels and tau/Aβ42 ratio in cerebrospinal fluid (Craft et al., 2012; Claxton et al., 2015). In line with these observations, patients with untreated diabetes present with higher phospho- and total-tau levels, higher phospho-tau/Aβ42 ratios, and higher rates of progression to dementia (McIntosh et al., 2019).

Other approaches have tried to improve cognitive function by targeting the activity of central glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptors (Hölscher and Li, 2010). Liraglutide (LRGT), specifically, is a GLP-1 receptor agonist that crosses the blood-brain barrier (Perry and Greig, 2005) and is currently being tested on patients with AD in the Evaluating Liraglutide in Alzheimer's Disease (ELAD) clinical trial (NCT01843075) (Femminella et al., 2019). Studies that used *in vitro* and *in vivo* models show that LRGT improves AD pathological features, such as amyloid and tau pathologies, inflammation, or oxidative stress (McClean et al., 2011; Chen et al., 2017; Duarte et al., 2020; Jantrapirom et al., 2020), and cognitive alterations (Chen et al., 2017; Batista et al., 2018) in AD. However, to our knowledge, LRGT has not been tested on complex models that harbor both T2D and AD. We have analyzed the long-term effects of LRGT on APP/PS1xdb/db mice, a mixed murine model with severe brain complications derived from chronic T2D and AD. The APP/PS1xdb/db mice show brain atrophy and altered amyloid pathology when compared with APP/PS1 mice. Increased tau phosphorylation and spontaneous bleeding are also observed in the APP/PS1xdb/db mice. These complications result in early cognitive dysfunction that can be detected when T2D is established, but amyloid pathology is still scarce (Ramos-Rodriguez et al., 2015; Infante-Garcia et al., 2016). Altogether, this mixed murine model reproduces a more complex version of the pathology that includes classical neuropathological features of AD and T2D. LRGT treatment may ameliorate metabolic alterations and related vascular damage in diabetic mice while limiting amyloid and tau pathologies, inflammation, or neuronal damage associated with both AD and T2D. Therefore, by acting

at different levels, LRGT may contribute in the maintenance of cognitive status when AD and T2D coexist, as commonly observed in the clinical arena (Janson et al., 2004).

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design: Animals and Treatments

AD-T2D mice were produced by cross-breeding APPswe/PS1dE9 (APP/PS1) [Tg (APPswe, PSEN1dE9) 85Dbo, stock no: 004462; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) with db/db mice (Harlan Laboratories, Boxmeer, Netherlands). APP/PS1 presents amyloid deposition at ≈4 months of age (Garcia-Alloza et al., 2006), and db/db mice are a functional knock out of the leptin receptor that only presents diabetic phenotype in homozygosis. Since heterozygous db/db mice do not present specific metabolic or central phenotype, the animals were grouped as follows: Control ($APP/PS1^{-/-}db/db^{+/+}$, $APP/PS1^{-/-}db/db^{\pm}$ mice), APP/PS1 ($APP/PS1^{\pm}db/db^{+/+}$ and $APP/PS1^{\pm}db/db^{\pm}$ mice), db/db ($APP/PS1^{-/-}db/db^{-/-}$ mice), and APP/PS1xdb/db ($APP/PS1^{\pm}db/db^{-/-}$ mice) as described previously (Ramos-Rodriguez et al., 2015; Infante-Garcia et al., 2016). The animals were randomly divided into groups and received LRGT as reported previously (Hansen et al., 2015). Briefly, the mice received an initial dose of subcutaneous LRGT (25 μg/kg/day) that was increased to 50, 100, 150, 200, 300, and 500 μg/kg/day daily during the first week From day seven, 500 μg/kg/day (133.3 nmol/Kg/day) of LRGT was administered to the mice daily for 20 weeks. T2D debuts at ≈6 weeks of age in db/db mice and by 26 weeks of age both AD and T2D are fully established in APP/PS1xdb/db mice. Therefore LRGT treatment commenced at 6 weeks of age an continued up to 26 weeks of age. Mice that did not receive LRGT received daily subcutaneous filtered PBS (vehicle). *In vivo* experiments included 31–34 females and 37–40 males randomly assigned to the treatment to complete the groups (Control $n = 9$–10, Control-LRGT $n = 9$–11, APP/PS1 $n = 9$–10, APP/PS1-LRGT $n = 10$–11, db/db $n = 7$–9, db/db-LRGT $n = 8$–12, APP/PS1xdb/db $n = 5$–7, and APP/PS1xdb/db-LRGT $n = 7$–8). Postmortem studies included 9–31 males and 11–26 females, depending on the assays, to complete the experimental groups (Control $n = 3$–8, Control-LRGT $n = 3$–6, APP/PS1 $n = 4$–8, APP/PS1-LRGT $n = 4$–9, db/db $n = 3$–7, db/db-LRGT $n = 3$–7, APP/PS1xdb/db $n = 3$–6, and APP/PS1xdb/db-LRGT $n = 3$–6). All experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Cadiz in accordance with the Guidelines for Care and Use of Experimental Animals (European Commission Directive 2010/63/UE and Spanish Royal Decree 53/2013).

Metabolic Determination

Body weight, non-fasting blood glucose levels, and plasma insulin levels were determined before the commencement of the treatment and every 4 weeks until sacrifice at 26 weeks. Blood glucose levels were measured from nicked tails using the glucometer Optium Xceed (Abbott, London, United Kingdom). For plasma insulin determination, blood was collected from the tail vein and placed in tubes with potassium-EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Blood samples were centrifuged for 7 min, 6,500 rpm at 4°C, and plasma fraction was stored at –80°C until it was processed. Plasma insulin levels were measured using an ultrasensitive mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Mercodia Inc., Winston-Salem, NC, USA).

Morris Water Maze

Behavioral assessment commenced after 18 weeks of treatment with LRGT. The acquisition phase was assessed 12 days prior to sacrifice. The pool was a round tank of 90 cm in diameter and water temperature was 21 ± 2°C. The animals performed four trials/day for 4 days, with the platform submerged in quadrant 2. Swimming commenced in each of the four virtual quadrants that the pool was divided in. Time limit was 60 s/trial, with a 10-min intertrial interval. If an animal did not find the platform, it was placed on the platform for 10 s. The retention phase started 24 h after the acquisition phase was completed, and it consisted of a single trial with the platform removed. Time required to locate the platform in the acquisition phase, percentage of time spent in quadrant 2 during the retention phase, and swim speed were analyzed using the Smart software (Panlab, Barcelona, Spain).

Actimetry and New Object Discrimination Task

Spontaneous motor activity test commenced the day after completion of the MWM. The mice were placed in a rectangular box (length 44 cm × width 22 cm × height 40 cm), and the distance traveled for 30 min was recorded. The new object discrimination test commenced the next day, as described previously (Dere et al., 2005; Ramos-Rodriguez et al., 2013). The animals were exposed to two objects, for habituation purposes, that were not used again during the object exploration task. On day 3, each mouse performed two sample trials and a test trial. On the first sample trial, the mice were allowed to explore for 5 min four copies of a novel object (navy balls) arranged in a triangle-shaped spatial configuration. After a 30-min delay, the mice performed a second sample trial with four novel objects (red cones) arranged in a quadratic-shaped spatial configuration, for 5 min. After 30 min, the mice performed a test trial with two copies of the object from sample trial 2 ("recent" objects) placed in the same position, and two copies of the object from sample trial 1 ("familiar" objects), with one placed in the same position ("old non-displaced" object) and the other in a new position ("familiar displaced" object). Integrated episodic memory for "what," "where," and "when" paradigms was analyzed as described previously (Dere et al., 2005). "What" was defined as the difference in time exploring familiar and recent objects, "where" was defined as the difference in time exploring displaced and non-displaced objects, and "when" was defined as the difference between time exploring familiar non-displaced objects and time exploring recent non-displaced objects.

Rotarod

Motor coordination was assessed by the rotarod (Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Spain). An animal was placed on a horizontal rod (3 cm in diameter and 5.7 cm wide), which is rotated around its longitudinal axis, and the animal must walk

forward to remain upright and not fall off (the height to fall is 16 cm). The animals were placed on the rod for 4 min at 4 revolutions per minute (rpm) for training purposes. During the test, the speed was increased from 4 to 40 rpm within 1 min. The time spent on the rod and the velocity when the animals fall was recorded.

Tissue Processing and Cresyl Violet Staining

The animals were sacrificed by intraperitoneal pentobarbital overdose (120 mg/kg). Brains were immediately harvested and weighed. Right hemispheres were dissected and frozen at −80°C until they were used. Left hemispheres were fixed in PFA 4%, and 30-μm coronal sections were obtained with cryostat (Microm HM 525; Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). Six sections located at 1.5, 0.5, −0.5, −1.5, −2.5, and −3.5 from Bregma, (Infante-Garcia et al., 2018), were selected. Briefly, the sections were dehydrated in 70% ethanol for 15 min and then incubated in a cresyl violet (Sigma, St. Louis, MO, USA) solution (0.5% w/v) for 10 min. After washing, tissue was fixed in 0.25% acetic acid in ethanol for 5 min, and subsequently in 100% ethanol and xylene for 2 min. The sections were mounted with DPX (Sigma, St. Louis, MO, USA). Images were acquired with an optical Olympus Bx60 microscope with an Olympus DP71 camera. Cell F (Olympus, Hamburg, Germany), Adobe Photoshop Elements and Image J software were used to process the images and measure cortex and hippocampus sizes.

Prussian Blue Staining

Sections contiguous to those used for cresyl violet staining were incubated by Prussian blue iron staining and neutral red counterstaining as described previously (Desestret et al., 2009), to analyze spontaneous hemorrhages. Images were acquired with an Olympus Bx60 (Olympus, Tokyo, Japan) microscope with an Olympus DP71 camera (Olympus, Tokyo, Japan) to assess the complete cortex and hippocampus. The images were analyzed using the Image J software to quantify hemorrhage burden in the cortex and hippocampus.

NeuN/DAPI Staining

Six sections located at 1.5, 0.5, −0.5, −1.5, −2.5, and −3.5 from Bregma were selected and blocked with BSA 3% and Triton X-100 0.5% during 1 h. Thereafter, the sections were incubated overnight at 4°C with anti-NeuN (Sigma, St. Louis, MO, USA) (Ref. MAB377) (1:200). Alexa Fluor donkey anti-mouse 594 was used as secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Ref. A21203) (1:1,000), followed by DAPI 1 mg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA) (Ref. D9542) (1:3,000) counterstain for 1 h. Amyloid plaques were stained with thioflavin S (TS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) (Ref. T1892) (0.01%) in H_2O/ethanol (1:1) for 10 min. The sections were mounted and photographed using an Olympus Bx60 (Olympus, Tokyo, Japan) microscope with an Olympus DP71 (Olympus, Tokyo, Japan) camera. The percentage of NeuN-positive cells (normalized by total cells stained with DAPI) was quantified in the cortex, close (<50 μm from plaque border) and far (>50 μm) from amyloid plaques using the Image J software (Ramos-Rodriguez et al., 2016; Infante-Garcia et al., 2018).

Axonal Immunostaining

Axonal curvature was analyzed after immunostaining with an SMI-312 antibody (Biolegend, San Diego, CA, USA) Ref. 837904) (1:1,000) as described (Infante-Garcia et al., 2017). Briefly, six sections 1 mm apart were pre-treated with hydrogen peroxide 3% and Triton X-100.5% for 20 min and blocked with 3% BSA for 1 h. Alexa Fluor goat anti-mouse 594 was used as secondary antibody (Molecular Probes, USA) (Ref. A11005) (1:200) for 1 h. Amyloid plaques were visualized with TS as described above. Micrographs of stained tissue were obtained with a Laser Olympus U-RFL-T (Olympus, Japan) fluorescent microscope and the MMIcellTools software. The Image J software was used for analysis purposes. Axon curvature ratio was calculated by dividing the end-to-end distance of a dendrite segment by the total length between the two segment ends. The distance to the closest amyloid plaque was measured at three points along each neurite, and the average distance was determined from these three measurements (Garcia-Alloza et al., 2010). At least 40 neurites were analyzed in each animal to complete 309–939 neurites/group. Curvatures were pooled in the proximity of amyloid plaques (up to 50 μm from the border), and neurites analyzed further from amyloid plaques borders were considered in SP-free areas. In the Control and db/db animals, axon curvature was compared with those measured in the APP/PS1 mice further than 50 μm from SP, as described previously (Garcia-Alloza et al., 2007a).

Aβ and Microglia Immunostaining

PFA-fixed 30-μm sections were pre-treated with 70% formic acid for 10 min and blocked in 3% BSA and 0.5% Triton-X100 for 1 h. The sections were incubated with anti-Iba1 (Wako, Osaka, Japan) (Ref. 019-19741) (1:1,000) and 4G8 (Biolegend, London, United Kingdom) (Ref. 800702) (1:2,000), antibodies overnight at 4°C in 0.5% BSA followed by secondary antibodies Alexa Fluor donkey anti-rabbit 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Ref. A21206) and Alexa Fluor donkey anti-mouse 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Ref. A21203) (1:1,000) for 2 h. Images were acquired using a Laser Olympus U-RFL-T (Olympus, Tokyo, Japan) fluorescent microscope and the MMIcellTools software. Microglia burden (% covered area) in the cortex and hippocampus was also analyzed in the proximity of (<50 μm) and far (>50 μm) from amyloid plaques in the case of the APP/PS1 and APP/PS1xdb/db mice, and in random selected areas in mice without amyloid plaques (Control and db/db), as described previously (Garcia-Alloza et al., 2007b; Ramos-Rodriguez et al., 2015). The Image J software was used to analyze the number, size, and burden of Aβ deposits in the cortex and hippocampus.

Aβ40, Aβ42, and Aβ Aggregates Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Soluble and insoluble Aβ40 and Aβ42 were quantified in the cortex and hippocampus with colorimetric ELISA kits (Wako, Osaka, Japan) (Aβ40, Ref. 294-62501; Aβ42, Ref. 290-62601) as described, with minor modifications (Infante-Garcia et al.,

2017). Tissue (5–10 mg) was homogenized in 50 μl of Pierce™ IP Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) (Ref. 87788) with Halt™ (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) (Ref. 78440) phosphatase and protease inhibitor cocktail and centrifuged (14,500 rpm) for 12 min at 4°C. Soluble Aβ40 and Aβ42 levels were measured in supernatants. The resultant pellet was extracted with 50 μl of 70% formic acid and centrifuged at 14,500 rpm for 10 min. Insoluble fraction was neutralized and diluted 1:30 with 1M Tris (pH 11). Human Aβ40 and Aβ42 provided in the kit were used for standard curves. Aβ aggregates were quantified using Human Amyloid β (82E1-specific) Aβ Oligomers Assay Kit (IBL, Hamburg, Germany) (Ref. 27725). The cortex was homogenized (1/5 w/v) in Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7.5) containing Halt™ phosphatase and protease inhibitor cocktail. Homogenates were then centrifuged (14,500 rpm) for 60 min at 4°C. The supernatant was collected and diluted 1:2 with EIA buffer provided in the kit. All absorbances were measured spectrophotometrically at 450 nm (MQX200R2; Biotek Instruments, Burlington, VT, USA), and data were expressed as pmol/g tissue.

Total-Tau and Phospho-Tau Levels

Total tau and tau phosphorylation levels were measured in cortical and hippocampal samples as described previously (Infante-Garcia et al., 2017). Tissue was homogenized in Pierce™ IP Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) (Ref. 87788) with Halt™ (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) (Ref. 78440) phosphatase and protease inhibitor cocktail. The homogenates were sonicated and centrifuged at 4°C for 5 min at 15,000 g. Supernatants were collected, and protein concentration was determined by Bradford protein assay (Bio-Rad, Madrid, Spain) (Ref. 5000006). Proteins were separated on 10% acrylamide-bisacrylamide gels, followed by electrophoretic transfer to PVDF membranes (Bio-Rad, Madrid, Spain) (Ref. 1620177). Membranes were then immersed in blocking buffer (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) (Ref. WB7050) for 1 h and incubated overnight at 4°C with mouse anti-phospho-tau antibody (1:1,000) (clon AT8) Thermo Fisher Scientific, Agawan, MA, USA) (Ref. MN1020) (1:1,000). Membranes were washed and then incubated with Secondary Antibody Solution Alk-Phos. Conjugated (Anti-Mouse) (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) (Ref. 10013103), and a chemiluminescent inmunodetection system for mouse and rabbit primary antibodies (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The membranes were washed, and signal was detected using Novex AP Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) (Ref. WP20002) in a ChemiDoc MP (Bio-rad, Madrid, Spain) imager. After stripping, the membranes were incubated with anti-total tau (1:1,000) (DAKO, Glostrup, Denmark) following the above procedure. Optical density was semi-quantified after normalizing to β-actin (Sigma, OR, USA) (Ref. A5441) (1:1,000) using the Image J software. Phospho-tau/total tau ratios were represented as percentage of control values.

IR-A, IR-B, and IGF-1R mRNA Expression

For rt-qPCR analysis, RNA was isolated from the cortex using TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Ref. 15596026) following the instructions of the manufacturer and resuspended in purified nuclease-free water. The RNA was quantified using a BioTek Synergy™ Mx (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) fluorometer. Complementary DNA (cDNA) was obtained from 500-ng RNA using iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) (Ref.1708890) on Techne Genius Thermal Cycler (Techne Ltd., Cambridge, United Kingdom). The 15-μl RT-qPCR reaction mix contained 7.5 μl 2X iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) (Ref. 1725122) 200 nmol (for IR-varA, IR-varB, and rRNA18S) or 900 nmol (for IGF-I) of forward and reverse primers, and 1 μl of the sample. The PCR thermal profile included 40 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at temperature according to each set of primers (61°C for IR-varA, 59°C for IR-varB, 64°C for IGF-I, and 55°C for rRNA18S) for 15 s, and extension at 72°C for 20 s, followed by melting curve analysis. Each sample was analyzed in triplicate, and 6–9 mice per group were included in the study. The mRNA level of rRNA18S was used as internal control. Relative quantification values of mRNA expression were calculated as $2-\Delta\Delta Ct$ with the comparative Ct method. First, internal control Ct values were subtracted from the gene-of-interest Ct values to derive a ΔCT value. The relative expression of the gene of interest was then evaluated using the expression $2-\Delta\Delta Ct$, where the value for ΔΔCt was obtained by subtracting the ΔCt of the calibrator from each ΔCT, using the mean of the control (Control animals) as the calibrator. The oligonucleotide primers used in this study were designed by BLAST and were obtained from Merck KGaA (Madrid, Spain) for IR-varA (FW:TTTGTCCCCAGGCCATCC-RV:ATCTGGAAGTGTGAGTGTGG), IR-varB (FW:AATGGTG CCGAGGACAGTA-RV:ATCTGGAAGTGTGAGTGTGG) and IGF-I (FW:CACAACTACTGCTCCAAAGACAAA-RV:TTTTC CGTCACCTCCTCCAC); rRNA18S (FW:CTCAACACGGGAA ACCTCAC-RV:CTCAACACGGGAAACCTCAC).

Statistical Analysis

One-way ANOVA for independent samples, followed by Tukey's b or Tamhane test, was performed when all the eight groups under study were compared. One-way ANOVA was also performed when only treated and untreated APP/PS1 and APP/PS1xdb/db mice were analyzed (Aβ levels, amyloid plaques, microglia, and neuronal curvature close to amyloid plaques). Two-way ANOVA (groupXday) was performed to analyze the acquisition phase in the MWM test. The SPSS v.24 software was used for all the statistical analyses. One-way ANOVA for independent samples was performed for further analysis of individual days during acquisition in the MWM. Data are presented as mean ± SEM.

RESULTS

Liraglutide Reduces Metabolic Alterations in T2D and AD-T2D Mice

When we analyzed glucose level evolution along treatment, we did not detect a significant groupXweek effect by two-way ANOVA for independent samples [$F_{(35,\ 380)}$ = 1.18,

$p = 0.227$]. However, further assessment of individual days revealed that the LRGT treatment reduced glucose levels in diabetic mice (**Figure 1A**). On week 6, in baseline untreated animals, plasma glucose in the db/db mice and APP/PS1xdb/db crosses were significantly increased compared with the Control and APP/PS1 mice. This increase in non-fasting glucose levels was more severe in the APP/PS1xdb/db animals ($p < 0.001$). By 10 weeks of age, glucose levels were significantly higher in the untreated db/db and APP/PS1xdb/db mice when compared with the LRGT-treated and untreated Control and APP/PS1xdb/db mice ($p < 0.01$). Differences in glucose levels between the untreated diabetic (db/db and APP/PS1xdb/db mice) and non-diabetic mice were maintained up to week 26 ($p < 0.01$). The LRGT treatment helped in limiting hyperglucemia in the db/db mice, and glucose levels reached control values by week 10 (after 4 weeks of LRGT treatment). Similarly, LRGT reduced non-fasting glucose levels in the APP/PS1xdb/db mice when compared with the untreated APP/SP1xdb/db animals by 10 weeks of age, and a similar profile was observed by 14 weeks of age. By 18 weeks, glucose levels in the APP/PS1xdb/db-LRGT mice were similar to those detected in the Control and APP/PS1 animals. Glycemic control was maintained in the db/db-LRGT and APP/PS1xdb/db-LRGT mice until the end of treatment (26 weeks of age).

When we analyzed insulin levels, we detected a significant groupXweek effect by two-way ANOVA for independent samples along treatment [$F_{(35,\ 384)} = 2.64$, $p < 0.01$]. Further differences were observed among the groups when we analyzed individual weeks (**Figure 1B**). On week 6, basal insulin levels in untreated animals were increased in the db/db mice, although differences with the Control and APP/PS1 animals only reached statistical significance in the APP/PS1xdb/db mice ($p < 0.01$). The fact that insulin levels were significantly increased in the APP/PS1xdb/db mice suggests an earlier metabolic compromise in the crossed model that requires an increase in pancreatic activity. By 10 weeks of age, statistical differences were observed in the db/db-LRGT and APP/PSxdb/db-LRGT mice when compared with the non-diabetic animals (Control and APP/PS1), suggesting an increase in insulin production in the LRGT-treated mice that allows for better glycemic control ($p < 0.01$). This situation was maintained from 14 to 26 weeks of age, and LRGT helped to increase insulin levels in the diabetic mice (db/db-LRGT and APP/PS1xb/db-LRGT) to control hyperglycemia.

We also detected a significant groupXweek effect by two-way ANOVA for independent samples [$F_{(35,\ 400)} = 3.13$, $^{**}p < 0.01$] when we analyzed body weight. Further assessment of individual weeks revealed that the LRGT treatment helped maintain body weight in cachectic APP/PS1xdb/db mice, as shown previously (Infante-Garcia et al., 2018; Hierro-Bujalance et al., 2020) (**Figure 1C**). By week 6 at baseline, the untreated diabetic mice (db/db and APP/PS1xdb/db) were overweight when compared with the non-diabetic mice (Control and APP/PS1) ($p < 0.01$). By week 10, all the diabetic mice, treated and untreated, presented significantly higher body weight when compared with the Control and APP/PS1 animals ($p < 0.01$), and these differences were maintained up to week 18 ($p < 0.01$). By week 22, the untreated APP/PS1xdb/db mice were still overweight when compared with the Control and APP/PS1 animals ($p < 0.01$); however, a slight reduction in body weight could be detected, indicative of a cachectic state, as described previously (Infante-Garcia et al., 2018; Hierro-Bujalance et al., 2020). Nevertheless, LRGT helped in maintaining the body weight of the APP/PS1xd/db mice, avoiding weight loss from week 22 until the end of the study (26 weeks).

Liraglutide Improves Cognitive Impairment in APP/PS1xdb/db Mice

As described previously, episodic memory was affected in the APP/PS1, db/db, and APP/PS1xdb/db mice in the new object discrimination test (Ramos-Rodriguez et al., 2015; Infante-Garcia et al., 2016), reaching statistical significance in the case of "what" and "where" paradigms when all the groups under study were compared (**Figure 2A**). Differences reached statistical significance when the untreated APP/PS1xdb/db mice were compared in the "what" and "where" paradigms ($p < 0.01$).

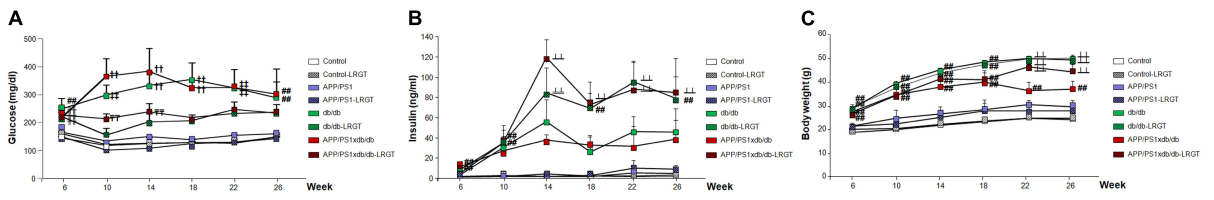


FIGURE 1 | Long-term liraglutide (LRTG) treatment ameliorates metabolic alterations in T2D and AD-T2D mice. **(A)** Non-fasting plasma glucose, **(B)** insulin, and **(C)** body weight were measured every 4 weeks in controls, APP/PS1, db/db and APP/PS1xdb/db mice treated with vehicle or LGRT 500 μg/kg for 20 weeks (from weeks 6 to 26) (complete statistical analysis included as a **Supplementary Material**). **(A)** LRGT significantly reduced postprandial glucose levels in diabetic mice: ($^{\#\#}p < 0.01$ Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT; ‡‡$p < 0.01$ vs. Control; $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT, and APP/PS1xdb/db-LRGT; ‡‡‡$p < 0.001$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, and db/db-LRGT; ŦŦ$p < 0.01$ vs. Control-LRGT). **(B)** Insulin levels were maintained by long-term LRGT treatment. At 6 weeks of age, immediately before the commencement of LRGT treatment, insulin levels were significantly increased in APP/PS1xdb/db mice ($^{\#\#}p < 0.01$ Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT; ⊥⊥$p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db, and APP/PS1xdb/db; ⊥⊥$p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, and APP/PS1xdb/db). **(C)** LRGT maintained body weight in APP/PS1-LRGT ($^{\#\#}p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, and APP/PS1-LRGT; $^{\#\#}p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, and APP/PS1-LRGT; ⊥⊥$p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, and APP/PS1xdb/db). Data are representative of 5–12 animals, and differences were detected by one-way ANOVA followed by Tukey's b or Tamhane test.

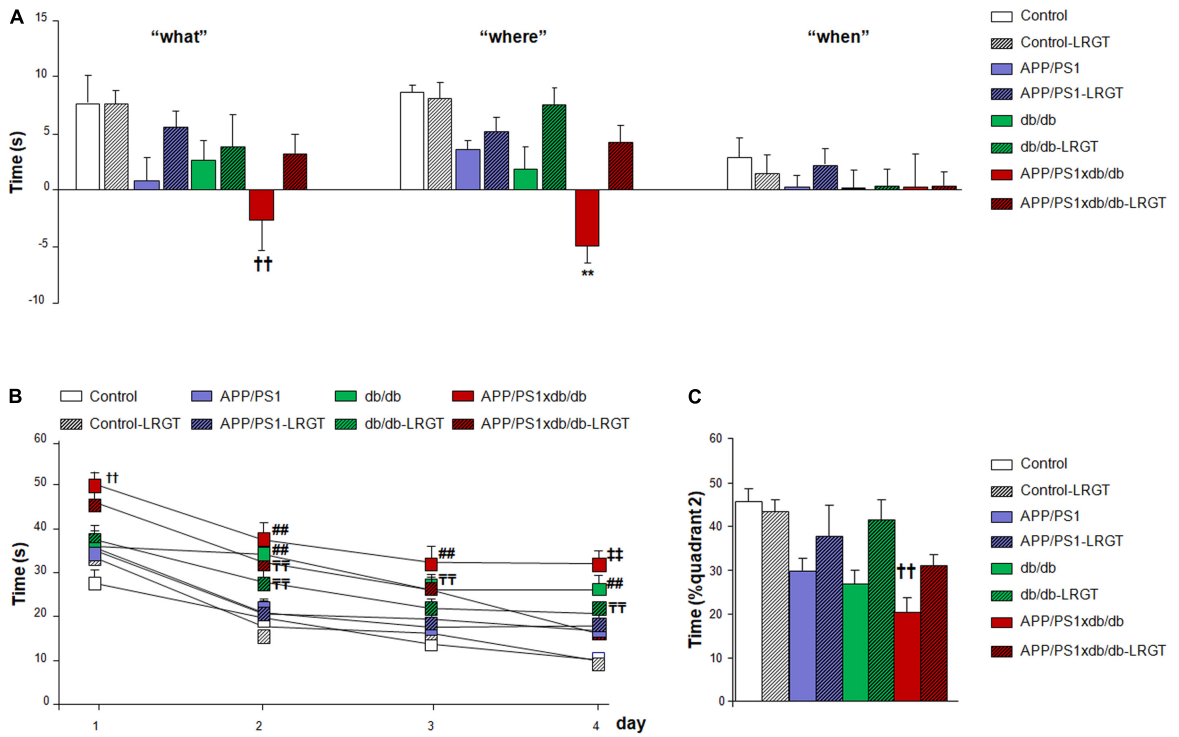


FIGURE 2 | LRGT treatment reduced cognitive impairment in APP/PS1xdb/db mice. Control, APP/PS1, db/db, and APP/PS1xdb/db animals were analyzed in the new object discrimination test for "what," "when," and "where" paradigms **(A)** as well as in the **(B,C)** Morris water maze test. Behavioral assessment commenced on week 24, after 18 weeks of LRGT treatment (500 μg/kg/day), and was completed on week 26 (complete statistical analysis included as a **Supplementary Material**). **(A)** LRGT improved episodic memory in the new object discrimination test. No differences were observed for the "when" paradigm; however, significant improvement was observed for the "what" ($^{\dagger\dagger}p = 0.009$ vs. Control, Control-LRGT, and APP/PS1-LRGT) and "where" ($^{**}p < 0.001$ vs. rest of the groups) paradigms. **(B)** LRGT also improved the performance along the acquisition phase in the MWM ($^{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db, and db/db-LRGT; $^{\#\#}p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, and APP/PS1-LRGT; $\overline{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs. Control and Control-LRGT; $\ddagger\ddagger p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT, and APP/PS1xdb/db-LRGT). **(C)** In the retention of the MWM, we observed that LRGT treatment also improved the performance of APP/PS1xdb/db-LRGT mice ($^{\dagger\dagger}p = 0.002$ vs. Control, Control-LRGT, and db/db-LRGT) (complete statistical analysis included in **Supplementary Material**). *Data are representative of 5–12 animals,* and differences were detected by one-way ANOVA followed by Tukey's b or Tamhane test.

Importantly, the LRGT treatment counterbalanced this situation, and the APP/PS1xdb/db-LRGT mice performed like the Control mice in both paradigms.

We did not detect a significant groupXday effect by two-way ANOVA for independent samples [$F_{(21,\ 1113)} = 0.985$, $p = 0.479$] when spatial memory was analyzed in the acquisition phase of the MWM. However, individual day assessment revealed that cognitive impairment in the db/db and APP/PS1xdb/db mice was significantly ameliorated by the LRGT treatment (**Figure 2B**). On day 1 of the acquisition phase, the APP/PS1xdb/db mice were already compromised when compared with the Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db, and db/db-LRGT mice ($p < 0.01$). This compromise was also observed on acquisition days 2–4 for the naïve APP/PS1xdb/db mice and db/db animals when compared with the LRGT-treated and untreated non-diabetic mice (Control and APP/PS1). An improvement was observed in diabetic mice after the LRGT treatment, although the times to locate the platform were still longer than those observed in the Control and Control-LRGT mice (**Figure 2B**). In the retention phase of the MWM, we observed that the APP/PS1xdb/db mice were compromised and spent significantly shorter times in the quadrant where the platform used to be located when compared with the Control mice ($p = 0.02$). However, after the LRGT treatment, differences were no longer observed between the APP/PS1xdb/db-LRGT and Control mice (**Figure 2C**).

We also analyzed motor activity by assessing different paradigms. When we analyzed the distance traveled in the open field, we observed that the diabetic mice (db/db and APP/PS1xdb/db) traveled shorter distances than the non-diabetic animals, although no statistical differences were observed among the groups under study (**Table 1**). Swimming speed in the MWM was also used to characterize motor alterations in all the groups under study (**Table 1**). As observed previously, in the diabetic mice (db/db and APP/PS1xd/db mice), swimming speeds were lower than those detected in the Control and APP/PS1 animals ($p < 0.01$). Similar differences between diabetic and non-diabetic mice were observed when motor activity was analyzed by time ($p < 0.01$) or maximum speed ($p < 0.01$) in the rotarod test (**Table 1**). However, no differences were observed in any of the paradigms (distance traveled in the open field, swimming speed in the MWR, and rotarod) when the db/db-LRGT or the

TABLE 1 | Motor activity assessment on liraglutide (LRGT)-treated mice.

	Distance traveled spontaneous motor activity (cm)	Swimming speed (cm/s)	Time in rotarod (s)	Rotarod speed (rpm)
Control	11921.50 ± 378.18	22.09 ± 1.04	15.55 ± 2.42	16.36 ± 2.18
Control-LRGT	11815.75 ± 658.06	19.33 ± 1.27	11.92 ± 2.11	13.25 ± 1.31
APP/PS1	12715.31 ± 707.07	21.28 ± 1.39	18.00 ± 2.74	15.80 ± 1.79
APP/PS1-LRGT	11456.10 ± 548.60	19.83 ± 0.71	14.30 ± 2.03	13.80 ± 1.31
db/db	9446.47 ± 1105.73	14.56 ± 0.88‡‡	2.33 ± 0.88‡‡	6.11 ± 0.80‡‡
db/db-LRGT	9343.74 ± 789.27	13.23 ± 0.59‡‡	2.44 ± 0.84‡‡	5.88 ± 0.63‡‡
APP/PS1xdb/db	9814.83 ± 2189.93	14.07 ± 1.48‡‡	2.67 ± 1.31‡‡	5.50 ± 0.92‡‡
APP/PS1xdb/db-LRGT	9626.63 ± 1344.51	14.48 ± 1.36‡‡	2.00 ± 0.38‡‡	5.75 ± 0.31‡‡

No differences were observed when the distance traveled by all the groups under study in the spontaneous motor activity test was compared [$F_{(6,\ 67)} = 2.1$, $p = 0.046$, no further differences detected]. Swimming speed in the MWM was significantly reduced in diabetic mice, and no differences were observed after LRGT treatment [$F_{(6,\ 61)} = 9.2$, ‡‡$p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, and APP/PS1-LRGT]. A similar profile was observed in the rotarod test when we analyzed time [$F_{(6,\ 68)} = 11.73$, ‡‡$p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, and APP/PS1-LRGT] and maximum speed [$F_{(6,\ 67)} = 11.31$, ‡‡$p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1 and APP/PS1-LRGT]. Data are representative of 5–14 animals, and differences were detected by one-way ANOVA followed by Tukey's b test or Tamhane as required.

APP/PS1xdb/db-LRGT mice were compared with the untreated db/db or the APP/PS1xdb/db animals, suggesting that the observed improvement in learning and memory is not due to changes in motor activity.

Liraglutide Limits Brain Atrophy and Neuronal Loss

Severe brain atrophy was detected in the db/db and APP/PS1xdb/db mice as described previously (Ramos-Rodriguez et al., 2015; Infante-Garcia et al., 2016) when all the groups under study were compared (**Figure 3A**). Brain weight was comparable between controls and APP/PS1 mice receiving vehicle, whereas the brain weight of vehicle-treated db/db and APP/PS1xdb/db mice was significantly reduced. On the other hand, LGRT-treated db/db and APP/PS1xdb/db brain weight was comparable with that of the vehicle and LGRT-treated controls and APP/PS1 mice (**Figure 3A**). Further assessment of brain structures revealed that cortical size was significantly reduced in the db/db and APP/PSxdb/db mice when compared with the untreated Control and APP/PS1xdb/db animals ($p < 0.01$). Nevertheless, the LRGT treatment significantly improved this situation in the diabetic animals, and cortical size in db/db-LRGT and APP/PS1xd/db-LRGT was comparable with that of the vehicle- and LRGT-treated controls and APP/PS1 mice (**Figures 3A,B**). Differences did not reach statistical significance in the hippocampus (**Figure 3A**).

We observed that neuronal density in the cortex was significantly reduced in the proximity of amyloid plaques when the APP/PS1xdb/db mice were compared with the APP/PS1 and APP/PS1-LRGT treated animals, while the LRGT-treated APP/PS1xdb/db mice presented values similar to those detected in the APP/PS1 and APP/PS1-LRGT mice (**Figures 3C,D**). In cortical areas far from amyloid plaques, we detected a significant compromise in the untreated APP/PS1 and db/db mice when compared with the Control and Control-LRGT mice ($p < 0.01$). This effect was more severe in the untreated APP/PS1xdb/db mice, and the LRGT treatment contributed to improve NeuN/DAPI ratio in this group, reaching statistical significance when the APP/PS1xdb/db and APP/PS1xdb/db-LRGT mice were compared (**Figures 3C,D**). The number of plaques in the hippocampus was low at 6 months of age, and in areas far from amyloid plaques, we observed that LRGT also helped in maintaining neuronal density (**Figure 3C**). In the untreated db/db mice, we observed that NeuN/DAPI ratios were significantly lower than those measured in the LRGT-treated and untreated Control and APP/PS1 animals ($p < 0.01$). The APP/PS1xdb/db mice showed a more severe reduction in NeuN/DAPI ratio that was statistically significant when compared with the LRGT-treated and untreated Control, APP/PS1, and db/db animals. The LRGT treatment improved NeuN/DAPI ratios in the hippocampus of the APP/PS1xdb/db mice, although they did not reach Control or APP/PS1 values (**Figure 3C**).

Neuronal Curvature Is Reduced After Liraglutide Treatment

Curvature ratio was increased in the proximity of amyloid plaques when the untreated APP/PS1xdb/db animals were compared with the APP/PS1 and APP/PS1-LRGT mice ($p = 0.04$). On the other hand, the LRGT treatment significantly improved neuronal curvature ratio in the APP/PS1xdb/db mice when compared with the untreated APP/PS1xdb/db mice ($p = 0.004$) (**Figures 3E,F**). A similar profile was observed in areas free from amyloid plaques when all the groups under study were compared (**Figures 3E,F**), and a significant compromise was observed in the untreated APP/PS1xdb/db animals when compared with the rest of the groups ($p < 0.01$). The LRGT treatment helped in limiting this situation, and while neuronal curvature in the APP/PS1xdb/db-LRGT mice did not reach Control values, a significant straightening effect was observed when the treated APP/PS1xdb/db mice where compared with the naïve animals ($p < 0.01$) (**Figure 3E**).

Liraglutide Reduces Aβ Pathology

As described previously, amyloid plaque burden is lower in the cortex from the APP/PS1xdb/db mice when compared with the APP/PS1 animals (Infante-Garcia et al., 2016). TS staining showed that amyloid plaque burden was significantly higher in the APP/PS1 mice than in the APP/PS1xdb/db animals ($p < 0.001$). The LRGT treatment contributed in reducing

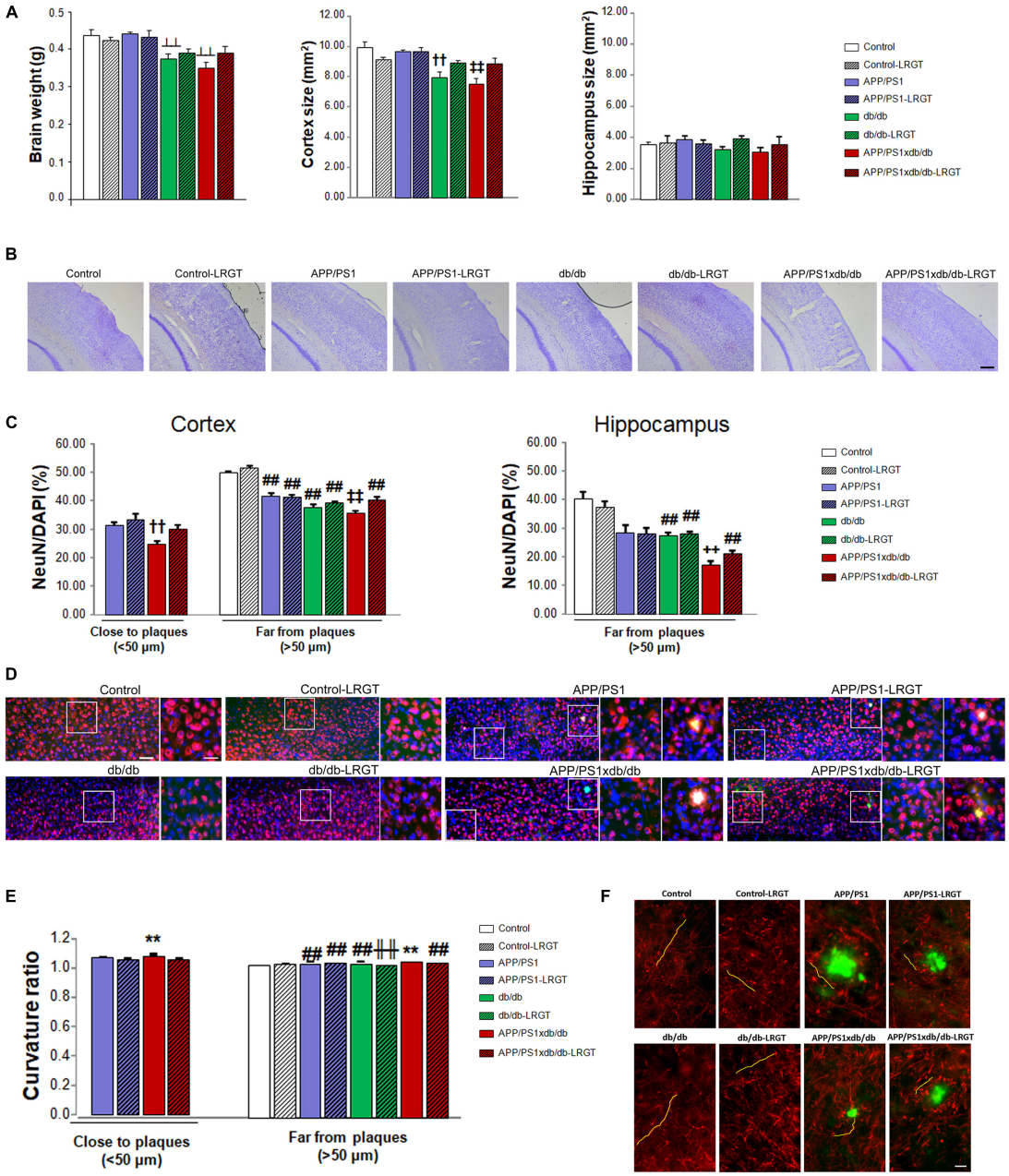


FIGURE 3 | Brain atrophy, neuronal density, and curvature are reduced by LRGT treatment. **(A,B)** Brain weight, cortex and hippocampal size, **(C,D)** NeuN/DAPI ratio, and **(E,F)** axonal curvature ratio were analyzed in all four genotypes (Control, APP/PS1, db/db, and APP/PS1xdb/db) under study and compared with animals by week 26, after 20 weeks on LRGT treatment (500 µg/kg/day) (complete statistical analysis included as a **Supplementary Material**). **(A)** Long-term LRGT limited brain weight loss ($\perp\perp p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db, and APP/PS1xdb/db). Cortical size was significantly improved by the LRGT treatment ($\ddagger\ddagger p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT, and APP/PS1xdb/db-LRGT; $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, and APP/PS1-LRGT). No differences were observed in the hippocampus. Data are representative of 4–5 animals. **(B)** Illustrative example of cresyl violet staining showing reduced cortical size in db/db and APP/PS1xdb/db mice. Scale bar = 200 um. **(C)** Neuronal density was reduced in the proximity of amyloid plaques in APP/PS1xdb/db mice, and LRGT ameliorated this situation ($^{\dagger\dagger}p = 0.008$ vs. APP/PS1 and APP/PS1-LRGT). A similar profile is observed in cortical and hippocampal areas with no amyloid plaques ($\ddagger\ddagger p < 0.001$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT, and APP/PS1xdb/db-LRGT; $^{\#\#}p < 0.01$ vs. Control and Control-LRGT; + + $p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db, and db/db-LRGT). Data are representative of five animals. **(D)** Illustrative example of NeuN (red) and DAPI (blue) staining in areas located in the proximity of amyloid plaques (TS staining, green) and in areas without amyloid plaques. Zoom-in images of representative regions are marked by white squares and presented next to the original image, including areas with and without amyloid plaques. Scale bar = 50 µm, insets scale bar = 25 µm. **(E)** LRGT reduced curvature ratio in the proximity of amyloid plaques ($^{**}p = 0.004$ vs. rest of the groups) and in areas free of amyloid plaques ($^{**}p < 0.01$ vs. rest of the groups, $^{\#\#}p < 0.01$ vs. Control and Control-LRGT, $\perp\perp p < 0.01$. vs. Control) (complete statistical analysis included in **Supplementary Material**). Data are representative of five animals per group (308–920 neurons/group). **(F)** Illustrative examples of SMI-312 (red) and TS (green) staining in the proximity of and far from amyloid plaques (yellow lines mark representative neurites). Scale bar = 10 µm.

amyloid plaque burden in the APP/PS1 animals ($p < 0.001$), whereas differences did not reach statistical significance when the untreated APP/PS1xdb/db mice were compared with the APP/PS1xdb/db-LRGT mice (**Figures 4A,B**). A similar profile was observed after 4G8 immunostaining, and differences reached statistical significance when the APP/PS1 mice were compared with the APP/PS1xdb/db and APP/PS1xdb/db-LRGT mice. No differences were observed among the groups when we assessed amyloid plaque burden in the hippocampus (**Figure 3A**). TS staining also revealed that the LRGT treatment reduced amyloid plaque size in the cortex from the APP/PS1 and APP/S1xdb/db mice when compared with the untreated animals ($p < 0.01$) (**Figure 4A**). We also observed that the LRGT treatment reduced 4G8-labeled plaques in the APP/PS1 and APP/PSxdb/db mice (**Figure 4A**). Amyloid plaque size was not significantly affected in the hippocampus when the treated and untreated APP/PS1 and APP/PS1xdb/db mice were compared (**Figure 4A**).

Soluble Aβ is slightly favored in the APP/PS1xdb/db mice when compared with the APP/PS1 mice (Ramos-Rodriguez et al., 2015). While we observed this profile, differences did not reach statistical significance when the LRGT-treated and untreated APP/PS1 and APP/PS1xdb/db mice were compared. Similar outcomes were detected when soluble Aβ42 levels were analyzed (**Figure 4C**). The LRGT treatment significantly reduced Aβ aggregates in the APP/PS1xdb/db mice when compared with the untreated animals ($p = 0.046$) (**Figure 4C**). Soluble Aβ42 levels were not affected in the hippocampus when all the four groups (APP/PS1, APP/PS-LRGT, APP/PS1xdb/db, and APP/PS1xdb/db-LRGT) were compared (**Figure 4C**). Insoluble Aβ40 ($p = 0.026$) and Aβ42 ($p = 0.011$) levels were reduced in untreated APP/PS1xdb/db when compared with the untreated APP/PS1 animals. Differences did not reach statistical significance when the APP/PS1xdb/db mice were compared with the APP/PS1xdb/db-LRGT animals (**Figure 4C**). Differences did not reach statistical significance when insoluble Aβ40 or Aβ42 levels were compared in the hippocampus (**Figure 4C**).

Liraglutide Limits Tau Pathology

We observed an increase in cortical tau phosphorylation in the db/db animals, although differences only reached statistical significance when the untreated APP/PS1xdb/db mice were compared with the Control animals ($p = 0.009$). LRGT reduced phospho-tau/total tau ratio in the APP/PS1xdb/db mice, and differences were no longer observed when the APP/PS1xdb/db-LRGT mice were compared with the Control animals (**Figures 4D,E**). Likewise, we also detected an increase in hippocampal tau phosphorylation in the db/db and APP/PS1xdb/db mice. While the LRGT treatment seemed to counterbalance this situation, no statistical differences were detected among any of the groups under study (**Figure 4D**).

Liraglutide Reduces Spontaneous Bleeding in APP/PS1xdb/db Mice

As described previously, hemorrhage burden in the cortex was significantly increased in the db/db and APP/PS1xdb/db mice when compared with the naïve Control and APP/PS1 animals ($p = 0.012$). Interestingly, the LRGT treatment reduced hemorrhage burden in the cortex from the db/db and APP/PS1xdb/db mice when compared with untreated animals of these genotypes. Cortical hemorrhage density was also significantly higher in the db/db and APP/PS1xdb/db mice than in the Control and APP/SP1 animals, and LRGT successfully limited hemorrhage density in the diabetic animals ($p < 0.001$) (**Figures 5A,B**). We did not observe significant differences among the groups when hemorrhage burden and density were analyzed in the hippocampus (**Figure 5A**).

Liraglutide Limits Microglia Activation in APP/PS1xdb/db Mice

Cortical microglia burden was significantly lower in the close proximity of amyloid plaques in APP/PS1xdb/db mice when compared with the APP/PS1 mice ($p < 0.001$), and the LRGT treatment reduced microglia burden both in the APP/PS1 and APP/PS1xdb/db mice when compared with the untreated APP/PS1 and APP/PS1xdb/db groups (**Figures 5C,D**). On the other hand, microglia burden was significantly higher in the untreated APP/PS1xdb/db mice than in the untreated Control, APP/PS1, and db/db mice in areas with no amyloid plaques ($p < 0.001$). The LRGT treatment reduced microglia burden in the db/db mice, and more robust differences were observed in the APP/PS1xdb/db mice after the LRGT treatment ($p < 0.001$). Differences did not reach statistical significance in the hippocampus when microglia burden in the proximity or far from the amyloid plaques (**Figure 5C**) was analyzed.

Liraglutide Has No Effect on mRNA Expression of IR-A, IR-B, or IGF-1R

When we analyzed IR-A mRNA expression, we did not observe any differences in the cortex from any of the groups under study (**Figure 5E**). Similar outcomes were observed for IR-B or IGF-1R (**Figure 5E**).

DISCUSSION

Patients with AD are in tremendous need of new therapeutic opportunities (Arvanitakis et al., 2019). The close relationship between T2D and AD (Ryu et al., 2019) supports the study on antidiabetic agents slowing down or counterbalancing AD brain pathology and cognitive impairment in animal models (Infante-Garcia et al., 2018; Hierro-Bujalance et al., 2020) and patients (Cao et al., 2018). GLP-1 analogs reduce amyloid and tau pathologies, inflammation, and cognitive impairment in different models (McClean et al., 2011; Chen et al., 2017; Batista et al., 2018; Duarte et al., 2020; Jantrapirom et al., 2020). Also, preliminary studies on humans show that LRGT might be neuroprotective in individuals at risk of AD, improving intrinsic connectivity within default mode network in the brain (Watson et al., 2019). Moreover, the ELAD trial is currently assessing the effect of LRGT on patients with AD (Femminella et al., 2019). However, as far as we know, no studies have analyzed the role of LRGT in complex models that harbor both AD and T2D, as regularly seen in the clinical arena. Therefore,

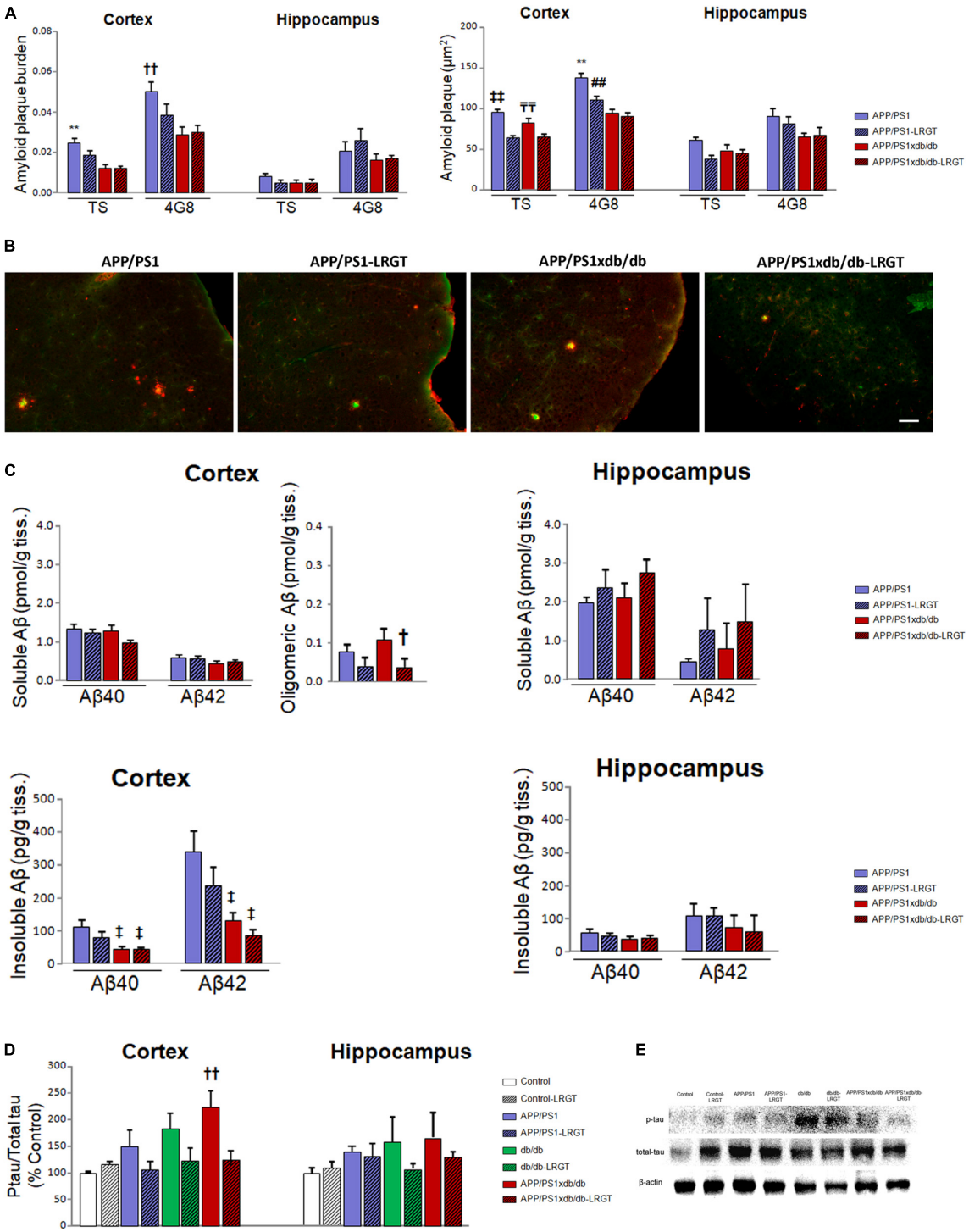


FIGURE 4 | LRGT affects amyloid and tau pathologies in APP/PS1xdb/db mice. **(A,B)** Amyloid plaque burden and size are quantified by thioflavin S and 4G8 staining. **(C)** Aβ40, Aβ42, and Aβ aggregates are also determined in APP/PS1 and APP/PS1xdb/db mice after liraglutide treatment (500 µg/kg/day) for 22 weeks. **(D,E)** Phospho-tau/total tau ratios are also measured in all the genotypes (Control, APP/PS1, db/db, and APP/PS1xdb/db) under study untreated or after LRGT treatment (complete statistical analysis included as a **Supplementary Material**). **(A)** LRGT treatment reduced amyloid plaque burden in the cortex from APP/PS1 mice (**$p < 0.01$ vs. rest of the groups; ††$p < 0.001$ vs. APP/PS1xdb/db, and APP/PS1xdb/db-LRGT). No differences were observed in the hippocampus. LRGT treatment also reduced amyloid plaque size in the cortex from APP/PS1xdb/db mice (‡‡$p < 0.01$ vs. APP/PS1-LRGT and APP/PS1xdb/db-LRGT, ŦŦ$p < 0.001$ vs. APP/PS1-LRGT; **$p < 0.01$ vs. rest of the groups, ##$p < 0.001$ APP/PS1xdb/db-LRGT). No differences were observed in the hippocampus. Data are representative of five animals. **(B)** Illustrative image of TS (green) and 4G8 (red) staining of amyloid plaques in the cortex from all the groups studied. Scale bar = 50 µm. **(C)** No

(Continued)

FIGURE 4 | differences were observed when soluble Aβ40 or Aβ42 levels were analyzed in the cortex. However, Aβ aggregates were significantly reduced in APP/PS1xdb/db mice on LRGT treatment (†$p = 0.046$ vs. APP/PS1xdb/db). No statistical differences were observed in the hippocampus for soluble Aβ40 or Aβ42 levels. Insoluble Aβ40 (‡$p = 0.026$ vs. APP/PS1) and Aβ42 (‡$p = 0.011$ vs. APP/PS1) levels are reduced in APP/PS1xdb/db when compared with APP/PS1 animals, and LRGT treatment contributes to further reductions in the cortex. No differences were observed in the hippocampus for insoluble Aβ40 or Aβ42. Data are representative of 6–9 animals. **(D)** Tau phosphorylation was reduced in the cortex after LRGT treatment (††$p = 0.009$ vs. Control). Differences did not reach statistical significance in the hippocampus. Data are representative of 3–11 mice. **(E)** Illustrative example of Western blot for phospho-tau, total tau, and β-actin in the cortex from all the groups studied.

we have analyzed the effects of long-term LRGT treatment in APP/PS1xdb/db mice, a mixed murine model that reproduces severe brain complications associated with T2D and AD (Infante-Garcia et al., 2016; Ramos-Rodriguez et al., 2017).

In our opinion, LRGT helps in maintaining body weight, in line with previous studies showing that antidiabetic treatments may limit body weight loss in cachectic diabetic mice (Sugizaki et al., 2017; Infante-Garcia et al., 2018; Hierro-Bujalance et al., 2020). The LRGT treatment could also help in lowering glucose levels by increasing insulin secretion in diabetic mice (db/db and APP/PS1xdb/db) in the long term, as described previously (Qin et al., 2018), suggesting that LRGT also contributes in maintaining pancreatic activity in diabetic animals, in line with previous studies (Fan et al., 2018; Li et al., 2018).

We also observed that brain atrophy in diabetic animals was significantly reduced by long-term LRGT treatment. We specifically assessed the cortex, as this region is preferentially affected in APP/PS1xdb/db mice (Ramos-Rodriguez et al., 2015; Infante-Garcia et al., 2016). The LRGT treatment maintained cortical size and thickness in the APP/PS1xdb/db mice. On the other hand, we did not detect significant differences in the hippocampus, in line with previous studies showing that this region is affected later in the APP/PS1xdb/db mice (Ramos-Rodriguez et al., 2015; Infante-Garcia et al., 2016). Further assessment of NeuN/DAPI ratio also revealed that LRGT helps in maintaining neuron population in the long term. We also observed that LRGT reduced neuronal curvature, indicating an overall improvement in neuronal wellness, as reported previously, *postmortem* (Jackson et al., 2016; Infante-Garcia et al., 2017; Ramos-Rodriguez et al., 2017) and *in vivo* (Garcia-Alloza et al., 2007a; Meyer-Luehmann et al., 2008), reinforcing a neuroprotective role for LRGT in AD and T2D.

Glucagon-like peptide 1 receptors are mainly expressed in β-pancreatic cells and the gastrointestinal system, although they are also found in the brain (Hamilton and Hölscher, 2009; Farr et al., 2016). GLP-1, as a growth factor, increases cell growth and proliferation, and it also reduces neuronal injury and hippocampal apoptosis (During et al., 2003). Moreover, GLP-1 analogs induce cell proliferation and differentiation, and stimulate neurite growth (Salcedo et al., 2012). Similarly, the neuroprotective role of LRGT has been largely assessed in models has been shown to have a capacity to prevent synapse loss and deterioration of synaptic plasticity in AD (McClean et al., 2011; Batista et al., 2018), supporting further assessment of LRGT treatment in patients with mild Alzheimer's dementia (Femminella and Edison, 2014). Other studies have also shown that LRGT enhances insulin sensitivity and improves insulin resistance (Kalra et al., 2010; Yamazaki et al., 2014; Tamura et al., 2015). Insulin resistance is not only a feature of diabetes pathology, but it is also an early alteration in AD, associated with basal elevations of insulin receptor substrate 1 (IRS1) phosphorylated in serine 616 (Talbot et al., 2012). Besides, serine phosphorylation of IRS1 is common in both AD and diabetes (Bomfim et al., 2012), and antidiabetic agents restore normal hippocampal formation responses to insulin in the IR–IRS-1–PI3K–Akt pathway (Bomfim et al., 2012). Similarly, LRGT significantly decreases IR aberrations in the APP/PS1 mice (Long-Smith et al., 2013). In our experiments, IR-A, IR-B, and IGF-1R mRNA expression levels were not significantly affected in APP/PS1xdb/db mice. While alterations at this level have been reported as a feasible link between AD and T2D (Holscher, 2021; Zheng and Wang, 2021), our studies did not include functional analysis, limiting the scope of our observations.

Liraglutide reduces tau hyperphosphorylation in both AD (Yang et al., 2013; Chen et al., 2017) and T2D models (Yang et al., 2013; Ma et al., 2015), indicating another feasible underlying mechanism for its neuroprotective role. While tau pathology is limited in the APP/PS1 mice, we observed a slight increase in tau phosphorylation both in the APP/PS1 and in db/db mice. Tau phosphorylation is significantly increased in the APP/PS1xdb/db animals, showing a synergistic effect when AD and T2D are set together (Ramos-Rodriguez et al., 2015; Infante-Garcia et al., 2016). Interestingly, early tau alterations, and not necessarily neurofibrillary tangles, might be critical for cognitive malfunctions (Hochgrafe et al., 2013), supporting the relevance of the AD-T2D crosstalk in tau pathology. We observed that the LRGT treatment reduces tau phosphorylation, as reported previously in AD models (Batista et al., 2018; Holubova et al., 2019; Jantrapirom et al., 2020), although to our knowledge the effects of LRGT on tau phosphorylation have not been assessed when AD-T2D coexist. On the other hand, the role of LRGT on amyloid pathology remains controversial, and previous studies have reported that LRGT has no effect on amyloid plaque burden in AD animals (Hansen et al., 2016). Our results are in line with observations reporting a reduction in amyloid pathology after LRGT treatment, such as significant reduction in the number of amyloid plaques (Holubova et al., 2019). LRGT also reverses amyloid plaque deposition (McClean et al., 2011; McClean and Hölscher, 2014), limits amyloid-related pathology (Batista et al., 2018; Jantrapirom et al., 2020), and even prevents amyloid deposition when administered prophylactically (McClean et al., 2015). While the burden of amyloid plaques in the APP/PS1xdb/db mice is lower than in the APP/PS1 animals (Ramos-Rodriguez et al., 2015; Infante-Garcia et al., 2016), an overall reduction of dense core plaque burden and plaque size is observed in the LRGT-treated mice. This is accompanied by a

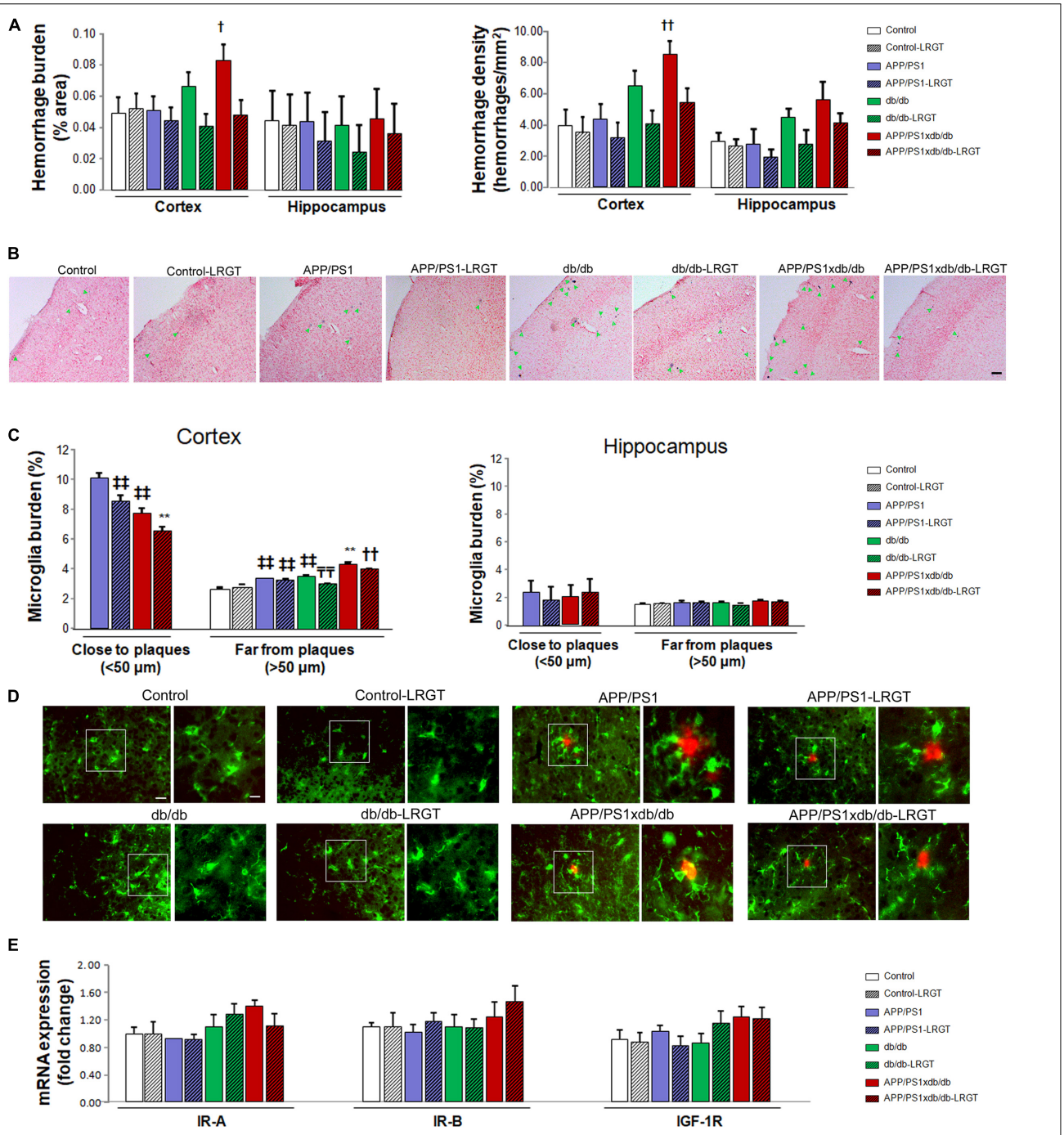


FIGURE 5 | Spontaneous bleeding and inflammation are reduced after LRGT treatment while IR-A, IR-B, and IGF-1R mRNA expression is not affected. Prussian blue staining is used to quantify hemorrhage burden and density in the cortex from untreated and treated mice (LRGT, 500 µg/kg/day) **(A,B)**. Microglia burden was quantified by Iba1 immunostaining in the proximity of (<50 µm) and far (>50 µm) from amyloid plaques in untreated and LRGT-treated animals **(C,D)**. IR-A, IR-B, and IGF-1R mRNA expression is also determined in the cortex from untreated and LRGT-treated mice **(E)** (complete statistical analysis included as a **Supplementary Material**). **(A)** LRGT treatment reduces hemorrhage burden in the cortex ($^{\dagger}p = 0.012$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db-LRGT, and APP/PS1xdb/db-LRGT). A similar profile was observed when we analyzed cortical hemorrhage density ($^{\dagger\dagger}p < 0.001$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, db/db-LRGT, and APP/PS1xdb/db-LRGT). No differences were detected in the hippocampus when hemorrhage burden or density was analyzed. Data are representative of 3–5 mice (489–1,012 hemorrhages/group). **(B)** Illustrative example of cortical hemorrhages stained with Prussian blue. Green arrows point at individual hemorrhages. Scale bar = 100 µm. **(C)** LRGT treatment reduced cortical microglia burden in APP/PS1 and APP/PS1xdb/db mice, in the proximity of amyloid plaques ($^{**}p < 0.01$ vs. rest of the groups, $^{\ddagger\ddagger}p < 0.01$ vs. APP/PS1). LRGT also reduced microglia burden in cortical amyloid plaque-free areas in diabetic mice ($^{**}p < 0.01$ vs. rest of the groups, $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, db/db, and db/db-LRGT, $^{\overline{\dagger\dagger}}p < 0.01$ vs. Control, Control-LRGT, APP/PS1, APP/PS1-LRGT, and db/db, $^{\ddagger\ddagger}p < 0.01$ vs. Control and Control-LRGT). No statistical differences were observed in the hippocampus close

(Continued)

FIGURE 5 | or far from amyloid plaques. Data are representative of five mice (cortex 572–748 ROIs/group; hippocampus 108–230, ROIs/group). **(D)** Illustrative example of cortical immunostaining for Iba1 (microglia, green) and 4G8 (amyloid plaques, red). Scale = 100 μm. Zoom-in images of representative regions are marked by white squares and presented next to the original image. Scale bar = 50 μm, inset scale bar = 10 μm. **(E)** No differences were observed in the cortex when we analyzed IR-A, IR-B, or IGF-1R mRNA expression. Data are representative of 6–9 mice.

slight reduction in Aβ levels, which is in line with prior studies on 3×Tg AD mice (Duarte et al., 2020). We also detected a significant reduction in Aβ aggregates in the APP/PS1xdb/db animals, as reported previously, in the APP/PS1 mice (McClean et al., 2011). Given the relevance Aβ pathology in AD, further studies would be required to fully characterize Aβ structures and to provide a full picture of changes observed when AD and T2D coexist, as well as after LRGT treatment.

The anti-inflammatory properties of LRGT may also contribute to its neuroprotective effects (McClean et al., 2015; Hernández et al., 2016; Barreto-Vianna et al., 2017; Duarte et al., 2020). LRGT successfully reduced microglia activation in the proximity of amyloid plaques and in amyloid-free areas, showing a beneficial effect in both AD and T2D mice. The AD-T2D animals show an increase in microglia burden, mostly in areas free of amyloid plaques (Infante-Garcia et al., 2016), and LRGT significantly counterbalances this effect. The inflammatory response seems to be significantly disrupted when AD and T2D coexist, and metabolic disease cooperates to enhance the profiles of cytokines involved in neuronal injury, amyloid and tau pathologies, or blood-brain barrier damage (Sankar et al., 2020). In this sense, the db/db and, more severely, the APP/PS1xdb/db mice present small vessel disease that significantly improved after LRGT treatment. LRGT has positive effects on the peripheral vasculature (de Mesquita et al., 2017; Breton-Romero et al., 2018), and while studies on brain vasculature are more scarce, LRGT preserves blood-brain barrier integrity in a model of traumatic brain injury (Hakon et al., 2015). It also increases microvessel density and endothelial cell proliferation, reducing infarct brain volume after focal cortical ischemia (Chen et al., 2018), ultimately supporting a beneficial role of LRGT at the vascular level.

Spatial learning and memory improved after LRTG treatment in the MWM. Episodic memory was also enhanced in the new object discrimination test. Studies on patients show that episodic memory is affected early in AD (Ferguson and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2021). Likewise, in patients with T2D-mild cognitive impairment, episodic memory correlated with glycated hemoglobin levels (Valenza et al., 2020). Our observations are in line with previous studies on AD models (McClean et al., 2011; McClean and Hölscher, 2014; Kamble et al., 2016; Chen et al., 2017) and diabetic mice (Yan et al., 2019). Clinical studies on the effects of LRGT on cognition are limited and controversial in some cases (for review Yaribeygi et al., 2021). Nevertheless, positive effects of LRTG and other GLP-1 analogs have been reported in prediabetic and diabetic patients (Vadini et al., 2020). Similarly, positive effects have been reported on patients with early AD and amnesic mild cognitive impairment (Watson et al., 2005), setting the basis for the ongoing assessment of LRGT in the ELAD trial (Femminella et al., 2019).

Our results support a positive role for LRGT at central level when AD and T2D coexist, as usually observed in the clinic (Janson et al., 2004). Brain atrophy, vascular damage, amyloid pathology, brain inflammation, and cognitive impairment are significantly ameliorated, supporting the beneficial role of LRGT in the brain and clinical studies on patients with AD.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation upon reasonable request.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Junta de Andalucia (Guidelines for Care and Use of Experimental Animals, European Commission Directive 2010/63/UE and Spanish Royal Decree 53/2013) and the University of Cadiz Bioethics Committee.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MC-N and AM: experiment design, data acquisition, analysis, and interpretation. CH-B, PA-M, CI-G, MV-S, MH, BB-C, and IA-N: data acquisition and analysis. SL-L: design and critical revision of the manuscript for intellectual content. MG-A: study concept and design and drafting and critical revision of manuscript for intellectual content. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis, and manuscript.

FUNDING

CH-B: predoctoral fellowship. University of Cadiz. PA-M: predoctoral fellowship. Instituto de Investigacion Biomedica de la Provincia de Cadiz (INIBICA). MG-A: Agencia Estatal de Investigación. Ministerio de Ciencia e Innovacion. Programa Estatal de Generación de Conocimiento y Fortalecimiento Científico y Tecnológico del Sistema de I + D + i y del Programa Estatal de I + D + i Orientada a los Retos de la Sociedad, del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2017-2020 (PID2020-115499RB-I0). Programa Estatal de I + D + I orientada a los Retos de la Sociedad (BFU 2016-75038-R), financed by the Agencia Estatal de Investigación (AEI) and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Subvención para la financiación de la Investigación y la Innovación Biomédica y en Ciencias de la Salud en el Marco de la Iniciativa Territorial

Integrada 2014–2020 para la Provincia de Cádiz. Consejeria de Salud. Junta de Andalucia. Union Europea, financed by the Fondo de Desarrollo Regional (FEDER) (PI-0008-2017).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Animal Facility of the University of Cadiz and its personnel for their help and support. We thank Servicios Centrales de Investigacion in Biomedicina (SC-IBM) from Universidad de Cadiz for the resources and technical support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2021.741923/full#supplementary-material

REFERENCES

Arvanitakis, Z., Schneider, J. A., Wilson, R. S., Li, Y., Arnold, S. E., Wang, Z., et al. (2006). Diabetes is related to cerebral infarction but not to AD pathology in older persons. *Neurology* 67, 1960–1965.

Arvanitakis, Z., Shah, R. C., and Bennett, D. A. (2019). Diagnosis and management of dementia: review. *JAMA* 322, 1589–1599.

Barreto-Vianna, A. R. C., Aguila, M. B., and Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2017). Beneficial effects of liraglutide (GLP1 analog) in the hippocampal inflammation. *Metab. Brain Dis.* 32, 1735–1745. doi: 10.1007/s11011-017-0059-4

Batista, A. F., Forny-Germano, L., Clarke, J. R., Lyra, E., Silva, N. M., Brito-Moreira, J., et al. (2018). The diabetes drug liraglutide reverses cognitive impairment in mice and attenuates insulin receptor and synaptic pathology in a non-human primate model of Alzheimer's disease. *J. Pathol.* 245, 85–100. doi: 10.1002/path.5056

Biessels, G. J., and Despa, F. (2018). Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 591–604.

Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Sathler, L. B., Brito-Moreira, J., Houzel, J. C., Decker, H., et al. (2012). An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease- associated Aβ oligomers. *J. Clin. Invest.* 122, 1339–1353. doi: 10.1172/JCI57256

Breton-Romero, R., Weisbrod, R. M., Feng, B., Holbrook, M., Ko, D., Stathos, M. M., et al. (2018). Liraglutide treatment reduces endothelial endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in patients with diabetes mellitus. *J. Am. Heart Assoc.* 7:e009379. doi: 10.1161/JAHA.118.009379

Cao, B., Rosenblat, J. D., Brietzke, E., Park, C., Lee, Y., Musial, N., et al. (2018). Comparative efficacy and acceptability of antidiabetic agents for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic review and network meta-analysis. *Diabetes Obes. Metab.* 20, 2467–2471. doi: 10.1111/dom.13373

Chatterjee, S., and Mudher, A. (2018). Alzheimer's disease and type 2 diabetes: a critical assessment of the shared pathological traits. *Front. Neurosci.* 12:383. doi: 10.3389/fnins.2018.00383

Chen, S., Sun, J., Zhao, G., Guo, A., Chen, Y., Fu, R., et al. (2017). Liraglutide improves water maze learning and memory performance while reduces hyperphosphorylation of tau and neurofilaments in APP/PS1/tau triple transgenic mice. *Neurochem. Res.* 42, 2326–2335. doi: 10.1007/s11064-017-2250-8

Chen, Y., Zhang, X., He, J., Xie, Y., and Yang, Y. (2018). Delayed administration of the glucagon-like peptide 1 analog liraglutide promoting angiogenesis after focal cerebral ischemia in mice. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 27, 1318–1325. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.12.015

Claxton, A., Baker, L. D., Hanson, A., Trittschuh, E. H., Cholerton, B., Morgan, A., et al. (2015). Long-acting intranasal insulin detemir improves cognition for adults with mild cognitive impairment or early-stage Alzheimer's disease dementia. *J. Alzheimers Dis.* 44, 897–906.

Craft, S., Baker, L. D., Montine, T. J., Minoshima, S., Watson, G. S., Claxton, A., et al. (2012). Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnestic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Arch. Neurol.* 69, 29–38.

Craft, S., Claxton, A., Baker, L. D., Hanson, A. J., Cholerton, B., Trittschuh, E. H., et al. (2017). Effects of regular and long-acting insulin on cognition and Alzheimer's disease biomarkers: a pilot clinical trial. *J. Alzheimers Dis.* 57, 1325–1334. doi: 10.3233/JAD-161256

de Mesquita, F. C., Guixe-Muntet, S., Fernandez-Iglesias, A., Maeso-Diaz, R., Vila, S., Hide, D., et al. (2017). Liraglutide improves liver microvascular dysfunction in cirrhosis: evidence from translational studies. *Sci. Rep.* 7:3255. doi: 10.1038/s41598-017-02866-y

Dere, E., Huston, J. P., and De Souza Silva, M. A. (2005). Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 16, 10–19.

Desestret, V., Brisset, J. C., Moucharrafie, S., Devillard, E., Nataf, S., Honnorat, J., et al. (2009). Early-stage investigations of ultrasmall superparamagnetic iron oxide-induced signal change after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Stroke* 40, 1834–1841. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.531269

Duarte, A. I., Candeias, E., Alves, I. N., Mena, D., Silva, D. F., Machado, N. J., et al. (2020). Liraglutide protects against brain amyloid-β_{1-42} accumulation in female mice with early Alzheimer's disease-like pathology by partially rescuing oxidative/nitrosative stress and inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 21:1746. doi: 10.3390/ijms21051746

During, M. J., Cao, L., Zuzga, D. S., Francis, J. S., Fitzsimons, H. L., Jiao, X., et al. (2003). Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat. Med.* 9, 1173–1179.

Fan, M., Jiang, H., Zhang, Y., Ma, Y., Li, L., and Wu, J. (2018). Liraglutide enhances autophagy and promotes pancreatic beta cell proliferation to ameliorate type 2 diabetes in high-fat-fed and streptozotocin-treated mice. *Med. Sci. Monit.* 24, 2310–2316. doi: 10.12659/msm.906286

Farr, O. M., Sofopoulos, M., Tsoukas, M. A., Dincer, F., Thakkar, B., Sahin-Efe, A., et al. (2016). GLP-1 receptors exist in the parietal cortex, hypothalamus and medulla of human brains and the GLP-1 analogue liraglutide alters brain activity related to highly desirable food cues in individuals with diabetes: a crossover, randomised, placebo-controlled trial. *Diabetologia* 59, 954–965. doi: 10.1007/s00125-016-3874-y

Femminella, G. D., and Edison, P. (2014). Evaluation of neuroprotective effect of glucagon-like peptide 1 analogs using neuroimaging. *Alzheimers Dement.* 10, S55–S61. doi: 10.1016/j.jalz.2013.12.012

Femminella, G. D., Frangou, E., Love, S. B., Busza, G., Holmes, C., Ritchie, C., et al. (2019). Evaluating the effects of the novel GLP-1 analogue liraglutide in Alzheimer's disease: study protocol for a randomised controlled trial (ELAD study). *Trials* 20:191.

Ferguson, C., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2021). A network psychometric approach to neurocognition in early Alzheimer's disease. *Cortex* 137, 61–73. doi: 10.1016/j.cortex.2021.01.002

Garcia-Alloza, M., Borrelli, L. A., Hyman, B. T., and Bacskai, B. J. (2010). Antioxidants have a rapid and long-lasting effect on neuritic abnormalities in APP:PS1 mice. *Neurobiol. Aging* 31, 2058–2068. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.11.006

Garcia-Alloza, M., Borrelli, L. A., Rozkalne, A., Hyman, B. T., and Bacskai, B. J. (2007a). Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J. Neurochem.* 102, 1095–1104. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04613.x

Garcia-Alloza, M., Ferrara, B. J., Dodwell, S. A., Hickey, G. A., Hyman, B. T., and Bacskai, B. J. (2007b). A limited role for microglia in antibody mediated plaque clearance in APP mice. *Neurobiol. Dis.* 28, 286–292. doi: 10.1016/j.nbd.2007.07.019

Garcia-Alloza, M., Robbins, E. M., Zhang-Nunes, S. X., Purcell, S. M., Betensky, R. A., Raju, S., et al. (2006). Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* 24, 516–524.

Hakon, J., Ruscher, K., Romner, B., and Tomasevic, G. (2015). Preservation of the blood brain barrier and cortical neuronal tissue by liraglutide, a long acting

glucagon-like-1 analogue, after experimental traumatic brain injury. *PLoS One* 10:e0120074. doi: 10.1371/journal.pone.0120074

Hamilton, A., and Hölscher, C. (2009). Receptors for the incretin glucagon-like peptide-1 are expressed on neurons in the central nervous system. *Neuroreport* 20, 1161–1166.

Hansen, H. H., Fabricius, K., Barkholt, P., Kongsbak-Wismann, P., Schlumberger, C., Jelsing, J., et al. (2016). Long-term treatment with liraglutide, a glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist, has no effect on β-amyloid plaque load in two transgenic app/ps1 mouse models of Alzheimer's disease. *PLoS One* 11:e0158205. doi: 10.1371/journal.pone.0158205

Hansen, H. H., Fabricius, K., Barkholt, P., Niehoff, M. L., Morley, J. E., Jelsing, J., et al. (2015). The GLP-1 receptor agonist liraglutide improves memory function and increases hippocampal CA1 neuronal numbers in a senescence-accelerated mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 46, 877–888. doi: 10.3233/JAD-143090

Hernández, C., Bogdanov, P., Corraliza, L., García-Ramírez, M., Solà-Adell, C., Arranz, J. A., et al. (2016). Topical administration of GLP-1 receptor agonists prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes. *Diabetes* 65, 172–187. doi: 10.2337/db15-0443

Hierro-Bujalance, C., Infante-Garcia, C., Del Marco, A., Herrera, M., Carranza-Naval, M. J., Suarez, J., et al. (2020). Empagliflozin reduces vascular damage and cognitive impairment in a mixed murine model of Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Alzheimers Res. Ther.* 12:40. doi: 10.1186/s13195-020-00607-4

Hochgrafe, K., Sydow, A., and Mandelkow, E. M. (2013). Regulatable transgenic mouse models of Alzheimer disease: onset, reversibility and spreading of Tau pathology. *FEBS J.* 280, 4371–4381. doi: 10.1111/febs.12250

Holscher, C. (2021). Protective properties of GLP-1 and associated peptide hormones in neurodegenerative disorders. *Br. J. Pharmacol.* Online ahead of print doi: 10.1111/bph.15508

Hölscher, C., and Li, L. (2010). New roles for insulin-like hormones in neuronal signalling and protection: new hopes for novel treatments of Alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging* 31, 1495–1502. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.08.023

Holubova, M., Hruba, L., Popelova, A., Bencze, M., Prazienkova, V., Gengler, S., et al. (2019). Liraglutide and a lipidized analog of prolactin-releasing peptide show neuroprotective effects in a mouse model of beta-amyloid pathology. *Neuropharmacology* 144, 377–387. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.11.002

Huang, C. C., Chung, C. M., Leu, H. B., Lin, L. Y., Chiu, C. C., Hsu, C. Y., et al. (2014). Diabetes mellitus and the risk of Alzheimer's disease: a nationwide population-based study. *PLoS One* 9:e87095.

Infante-Garcia, C., Jose Ramos-Rodriguez, J., Delgado-Olmos, I., Gamero-Carrasco, C., Teresa Fernandez-Ponce, M., Casas, L., et al. (2017). Long-term mangiferin extract treatment improves central pathology and cognitive deficits in APP/PS1 Mice. *Mol. Neurobiol.* 54, 4696–4704. doi: 10.1007/s12035-016-0015-z

Infante-Garcia, C., Ramos-Rodriguez, J. J., Galindo-Gonzalez, L., and Garcia-Alloza, M. (2016). Long-term central pathology and cognitive impairment are exacerbated in a mixed model of Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Psychoneuroendocrinology* 65, 15–25. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.12.001

Infante-Garcia, C., Ramos-Rodriguez, J. J., Hierro-Bujalance, C., Ortegon, E., Pickett, E., Jackson, R., et al. (2018). Antidiabetic polypill improves central pathology and cognitive impairment in a mixed model of Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Mol. Neurobiol.* 55, 6130–6144. doi: 10.1007/s12035-017-0825-7

Jackson, R. J., Rudinskiy, N., Herrmann, A. G., Croft, S., Kim, J. M., Petrova, V., et al. (2016). Human tau increases amyloid beta plaque size but not amyloid beta-mediated synapse loss in a novel mouse model of Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.* 44, 3056–3066.

Janson, J., Laedtke, T., Parisi, J. E., O'Brien, P., Petersen, R. C., and Butler, P. C. (2004). Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* 53, 474–481.

Jantrapirom, S., Nimlamool, W., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S., Temviriyanukul, P., Inthachat, W., et al. (2020). Liraglutide suppresses tau hyperphosphorylation, amyloid beta accumulation through regulating neuronal insulin signaling and BACE-1 activity. *Int. J. Mol. Sci.* 21:1725. doi: 10.3390/ijms21051725

Kalra, S., Kalra, B., Kumar, S., and Sharma, A. (2010). Managing insulin resistance: role of liraglutide. *Clin. Pharmacol.* 2, 131–134.

Kamble, M., Gupta, R., Rehan, H. S., and Gupta, L. K. (2016). Neurobehavioral effects of liraglutide and sitagliptin in experimental models. *Eur. J. Pharmacol.* 774, 64–70. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.02.003

Li, Y., Zheng, J., Shen, Y., Li, W., Liu, M., Wang, J., et al. (2018). Comparative study of liraglutide and insulin glargine on glycemic control and pancreatic beta-cell function in db/db mice. *Med. Sci. Monit.* 24, 3293–3300. doi: 10.12659/MSM.907227

Long-Smith, C. M., Manning, S., McClean, P. L., Coakley, M. F., O'Halloran, D. J., Holscher, C., et al. (2013). The diabetes drug liraglutide ameliorates aberrant insulin receptor localisation and signalling in parallel with decreasing both amyloid-β plaque and glial pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 15, 102–114. doi: 10.1007/s12017-012-8199-5

Luchsinger, J. A., Palta, P., Rippon, B., Sherwood, G., Soto, L., Ceballos, F., et al. (2020). Pre-diabetes, but not type 2 diabetes, is related to brain amyloid in late middle-age. *J. Alzheimers Dis.* 75, 1241–1252.

Ma, D. L., Chen, F. Q., Xu, W. J., Yue, W. Z., Yuan, G., and Yang, Y. (2015). Early intervention with glucagon-like peptide 1 analog liraglutide prevents tau hyperphosphorylation in diabetic db/db mice. *J. Neurochem.* 135, 301–308. doi: 10.1111/jnc.13248

McClean, P. L., and Hölscher, C. (2014). Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 76(Pt A), 57–67. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.005

McClean, P. L., Jalewa, J., and Hölscher, C. (2015). Prophylactic liraglutide treatment prevents amyloid plaque deposition, chronic inflammation and memory impairment in APP/PS1 mice. *Behav. Brain Res.* 293, 96–106. doi: 10.1016/j.bbr.2015.07.024

McClean, P. L., Parthsarathy, V., Faivre, E., and Hölscher, C. (2011). The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 31, 6587–6594. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0529-11.2011

McIntosh, E. C., Nation, D. A., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2019). Importance of treatment status in links between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Diabetes Care* 42, 972–979.

Meyer-Luehmann, M., Spires-Jones, T. L., Prada, C., Garcia-Alloza, M., de Calignon, A., Rozkalne, A., et al. (2008). Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451, 720–724. doi: 10.1038/nature06616

Moran, C., Beare, R., Phan, T. G., Bruce, D. G., Callisaya, M. L., Srikanth, V., et al. (2015). Type 2 diabetes mellitus and biomarkers of neurodegeneration. *Neurology* 85, 1123–1130.

Natunen, T., Martiskainen, H., Marttinen, M., Gabbouj, S., Koivisto, H., Kemppainen, S., et al. (2020). Diabetic phenotype in mouse and humans reduces the number of microglia around beta-amyloid plaques. *Mol. Neurodegener.* 15:66. doi: 10.1186/s13024-020-00415-2

Perry, T., and Greig, N. H. (2005). Enhancing central nervous system endogenous GLP-1 receptor pathways for intervention in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2, 377–385.

Pruzin, J. J., Schneider, J. A., Capuano, A. W., Leurgans, S. E., Barnes, L. L., Ahima, R. S., et al. (2017). Diabetes, hemoglobin A1C, and regional Alzheimer disease and infarct pathology. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 31, 41–47. doi: 10.1097/WAD.0000000000000172

Qin, Y., Chen, M., Yang, Y., Zhou, X. R., Shao, S. Y., Wang, D. W., et al. (2018). Liraglutide improves hepatic insulin resistance via the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 17, 7372–7380. doi: 10.3892/mmr.2018.8737

Ramos-Rodriguez, J. J., Infante-Garcia, C., Galindo-Gonzalez, L., Garcia-Molina, Y., Lechuga-Sancho, A., and Garcia-Alloza, M. (2016). Increased spontaneous central bleeding and cognition impairment in APP/PS1 mice with poorly controlled diabetes mellitus. *Mol. Neurobiol.* 53, 2685–2697. doi: 10.1007/s12035-015-9311-2

Ramos-Rodriguez, J. J., Jimenez-Palomares, M., Murillo-Carretero, M. I., Infante-Garcia, C., Berrocoso, E., Hernandez-Pacho, F., et al. (2015). Central vascular disease and exacerbated pathology in a mixed model of type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology* 62, 69–79. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.07.606

Ramos-Rodriguez, J. J., Ortiz, O., Jimenez-Palomares, M., Kay, K. R., Berrocoso, E., Murillo-Carretero, M. I., et al. (2013). Differential central pathology and cognitive impairment in pre-diabetic and diabetic mice. *Psychoneuroendocrinology* 38, 2462–2475. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.05.010

Ramos-Rodriguez, J. J., Ortiz-Barajas, O., Gamero-Carrasco, C., de la Rosa, P. R., Infante-Garcia, C., Zopeque-Garcia, N., et al. (2014). Prediabetes-induced vascular alterations exacerbate central pathology in APPswe/PS1dE9 mice. *Psychoneuroendocrinology* 48, 123–135. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.06.005

Ramos-Rodriguez, J. J., Spires-Jones, T., Pooler, A. M., Lechuga-Sancho, A. M., Bacskai, B. J., and Garcia-Alloza, M. (2017). Progressive neuronal pathology and synaptic loss induced by prediabetes and type 2 diabetes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 54, 3428–3438. doi: 10.1007/s12035-016-9921-3

Ryu, J. C., Zimmer, E. R., Rosa-Neto, P., and Yoon, S. O. (2019). Consequences of metabolic disruption in Alzheimer's disease pathology. *Neurotherapeutics* 16, 600–610.

Salas, I. H., and De Strooper, B. (2019). Diabetes and Alzheimer's disease: a link not as simple as it seems. *Neurochem. Res.* 44, 1271–1278.

Salcedo, I., Tweedie, D., Li, Y., and Greig, N. H. (2012). Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: an emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders. *Br. J. Pharmacol.* 166, 1586–1599. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01971.x

Sankar, S. B., Infante-Garcia, C., Weinstock, L. D., Ramos-Rodriguez, J. J., Hierro-Bujalance, C., Fernandez-Ponce, C., et al. (2020). Amyloid beta and diabetic pathology cooperatively stimulate cytokine expression in an Alzheimer's mouse model. *J. Neuroinflammation* 17:38. doi: 10.1186/s12974-020-1707-x

Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A., and Feldman, E. L. (2010). How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nat. Rev. Neurol.* 6, 551–559.

Sugizaki, T., Zhu, S., Guo, G., Matsumoto, A., Zhao, J., Endo, M., et al. (2017). Treatment of diabetic mice with the SGLT2 inhibitor TA-1887 antagonizes diabetic cachexia and decreases mortality. *NPJ Aging Mech. Dis* 3:12. doi: 10.1038/s41514-017-0012-0

Takeda, S., Sato, N., Uchio-Yamada, K., Sawada, K., Kunieda, T., Takeuchi, D., et al. (2010). Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 7036–7041. doi: 10.1073/pnas.1000645107

Talbot, K., Wang, H. Y., Kazi, H., Han, L. Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., et al. (2012). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 122, 1316–1338. doi: 10.1172/JCI59903

Tamura, K., Minami, K., Kudo, M., Iemoto, K., Takahashi, H., and Seino, S. (2015). Liraglutide improves pancreatic Beta cell mass and function in alloxan-induced diabetic mice. *PLoS One* 10:e0126003. doi: 10.1371/journal.pone.0126003

Vadini, F., Simeone, P. G., Boccatonda, A., Guagnano, M. T., Liani, R., Tripaldi, R., et al. (2020). Liraglutide improves memory in obese patients with prediabetes or early type 2 diabetes: a randomized, controlled study. *Int. J. Obes.* 44, 1254–1263.

Valenza, S., Paciaroni, L., Paolini, S., Bonfigli, A. R., Di Rosa, M., Rabini, R. A., et al. (2020). Mild cognitive impairment subtypes and type 2 diabetes in elderly subjects. *J. Clin. Med.* 9:2055.

Vieira, M. N. N., Lima-Filho, R. A. S., and De Felice, F. G. (2018). Connecting Alzheimer's disease to diabetes: underlying mechanisms and potential therapeutic targets. *Neuropharmacology* 136, 160–171.

Wang, J. Q., Yin, J., Song, Y. F., Zhang, L., Ren, Y. X., Wang, D. G., et al. (2014). Brain aging and AD-like pathology in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Diabetes Res.* 2014:796840. doi: 10.1155/2014/796840

Wang, K. C., Woung, L. C., Tsai, M. T., Liu, C. C., Su, Y. H., and Li, C. Y. (2012). Risk of Alzheimer's disease in relation to diabetes: a population-based cohort study. *Neuroepidemiology* 38, 237–244.

Watson, G. S., Cholerton, B. A., Reger, M. A., Baker, L. D., Plymate, S. R., Asthana, S., et al. (2005). Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnestic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 13, 950–958. doi: 10.1176/appi.ajgp.13.11.950

Watson, K. T., Wroolie, T. E., Tong, G., Foland-Ross, L. C., Frangou, S., Singh, M., et al. (2019). Neural correlates of liraglutide effects in persons at risk for Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* 356, 271–278. doi: 10.1016/j.bbr.2018.08.006

Yamazaki, S., Satoh, H., and Watanabe, T. (2014). Liraglutide enhances insulin sensitivity by activating AMP-activated protein kinase in male Wistar rats. *Endocrinology* 155, 3288–3301. doi: 10.1210/en.2013-2157

Yan, W., Pang, M., Yu, Y., Gou, X., Si, P., Zhawatibai, A., et al. (2019). The neuroprotection of liraglutide on diabetic cognitive deficits is associated with improved hippocampal synapses and inhibited neuronal apoptosis. *Life Sci.* 231:116566. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116566

Yang, Y., Zhang, J., Ma, D., Zhang, M., Hu, S., Shao, S., et al. (2013). Subcutaneous administration of liraglutide ameliorates Alzheimer-associated tau hyperphosphorylation in rats with type 2 diabetes. *J. Alzheimers Dis.* 37, 637–648. doi: 10.3233/JAD-130491

Yaribeygi, H., Rashidy-Pour, A., Atkin, S. L., Jamialahmadi, T., and Sahebkar, A. (2021). GLP-1 mimetics and cognition. *Life Sci.* 264:118645.

Zheng, M., and Wang, P. (2021). Role of insulin receptor substance-1 modulating PI3K/Akt insulin signaling pathway in Alzheimer's disease. *3 Biotech* 11:179. doi: 10.1007/s13205-021-02738-3

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

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

Copyright © 2021 Carranza-Naval, del Marco, Hierro-Bujalance, Alves-Martinez, Infante-Garcia, Vargas-Soria, Herrera, Barba-Cordoba, Atienza-Navarro, Lubian-Lopez and Garcia-Alloza. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Vargas-Soria et al. Alzheimer's Research & Therapy (2021) 13:112
https://doi.org/10.1186/s13195-021-00853-0

Alzheimer's Research & Therapy

MINI REVIEW Open Access

Role of liraglutide in Alzheimer's disease pathology

Maria Vargas-Soria[1†], Maria Jose Carranza-Naval[1,2†], Angel del Marco[1*] and Monica Garcia-Alloza[1*]

Abstract

Background: The described relationship between Alzheimer's disease (AD) and type 2 diabetes (T2D) and the fact that AD has no succesful treatment has led to the study of antidiabetic drugs that may limit or slow down AD pathology.

Main body: Although T2D treatment has evident limitations, options are increasing including glucagon-like peptide 1 analogs. Among these, liraglutide (LRGT) is commonly used by T2D patients to improve β cell function and suppress glucagon to restore normoglycaemia. Interestingly, LRGT also counterbalances altered brain metabolism and has anti-inflammatory properties. Previous studies have reported its capacity to reduce AD pathology, including amyloid production and deposition, tau hyperphosphorylation, or neuronal and synaptic loss in animal models of AD, accompanied by cognitive improvement. Given the beneficial effects of LRGT at central level, studies in patients have been carried out, showing modest beneficial effects. At present, the ELAD trial (Evaluating Liraglutide in Alzheimer's Disease NCT01843075) is an ongoing phase IIb study in patients with mild AD. In this minireview, we resume the outcomes of LRGT treatment in preclinical models of AD as well as the available results in patients up to date.

Conclusion: The effects of LRGT on animal models show significant benefits in AD pathology and cognitive impairment. While studies in patients are limited, ongoing clinical trials will probably provide more definitive conclusions on the role of LRGT in AD patients.

Keywords: Liraglutide, Alzheimer's disease, Amyloid, Tau, Inflammation, Cognition

Background

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia. Type 2 diabetes (T2D) may increase the risk to suffer AD over two-fold [1, 2]. However, it remains unclear whether T2D and AD are parallel phenomena or synergistic diseases linked by vicious pathological cycles [3]. In this sense, findings in patients relating T2D to AD classical pathology are inconsistent [4]. However, T2D increases the risk to develop AD, even after adjusting for vascular risk factors [5, 6] and if only 10% of diabetic patients end up suffering AD, the number of AD patients will double [2]. This situation and the fact that AD has no successful treatment supports the study of antidiabetic drugs that may reduce or slow down AD pathology.

Liraglutide (LRGT) is a glucagon-like peptide 1(GLP-1) analog that has been widely assessed in animal models of AD. Initial studies with patients have shown modest beneficial effects and it is currently under evaluation in the ELAD trial (Evaluating Liraglutide in Alzheimer's Disease NCT01843075). We have reviewed available bibliography on the potential mechanisms through which LRGT may benefit AD. An overall improvement of brain metabolic alterations, amyloid (Aβ) and tau

* Correspondence: angeljose.delmarco@uca.es; monica.garcia@uca.es
†Maria Vargas-Soria and Maria Jose Carranza-Naval contributed equally to this work.
[1]Division of Physiology, School of Medicine, Instituto de Investigacion Biomedica de Cadiz (INIBICA), Universidad de Cadiz, Edificio Andres Segovia, C/Dr. Maranon 3, 3er piso, Cadiz, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

pathologies, inflammation, and neuronal damage are observed in animal models, supporting further studies in patients.

Main text

Preclinical studies

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) is implicated in the control of glycemia and metabolic homeostasis, both in the periphery and the central nervous system [7, 8]. Due to the importance of GLP-1 signaling on cognitive function [9] and the relationship between AD and T2D [10], GLP-1 analogs, and LRGT specifically, may provide a relevant venue to ameliorate AD pathology [11]. Previous studies have shown some controversial outcomes in AD models. Whereas brain weight [12, 13], hippocampal insulin [13–16], cortical glucose levels or brain GLUT1 and GLUT4 [13] do not seem to be affected, LRGT treatment increases GLP1-receptors in the hippocampus of AD mice [15–17]. Similarly, LRGT also increases insulin receptor levels in a primate model of AD [14], although no differences have been observed in AD mice [18]. LRGT ameliorates insulin resistance in the hippocampus by reducing phosphorylated insulin receptor levels [19, 20] and insulin receptor substrate-1 [19, 20]. Interestingly, insulin degrading enzyme, that is reduced in AD preclinical models and a feasible underlying mechanism for AD and T2D [21, 22], is preserved or increased in the cortex and hippocampus from AD mice after LRGT treatment [18, 20].

Autopsy cohort studies have revealed a limited role of T2D on classical AD neuropathological features (amyloid (Aβ) plaques and tau tangles) [4]. However, studies in animals show an overall improvement after different administration protocols [12, 13, 23, 24], including prophylactic [23] and long-term treatments [23, 25–27]. Whereas some studies have reported no effects on amyloid pathology [28], the majority of the results show that LRGT dramatically reduces Aβ plaque size [29], number [19, 29], and burden [18, 23, 30–32]. LRGT also decreases Aβ aggregates [30] and restores increased levels of β-secretase 1 and presenilin 1 [17] in the brain from an AD mice, once Aβ pathology is fully established (Fig. 1). Moreover, positive effects have also been observed when LRGT is administered before Aβ plaques deposit [23]. In addition, LRGT limits tau hyperphosphorylation by modulating the activity of ERK and JNK in 3xTgAD [12, 13], APP/PS1 [29], and hTauP301L mice [33]. Likewise, LRGT reduces hippocampal tau phosphorylation by modulating Akt and GSK-3β [15], and in hyperhomocysteinemic rats, tau hyperphosphorylation is reduced through the activation of PP2Ac [17]. Likewise, LRGT neuroprotection is mediated by a reduction of neurofilament phosphorylation in 3xTgAD animals [12]. LRGT also improves synaptic plasticity [18, 34], density [14], structure [15, 27], and synapsis number [35], increasing synaptophysin and PSD-95 levels in AD mice [23, 30, 35] together with increased long-term potentiation and paired-pulse facilitation [18, 30, 34, 35]. NMDA synapse-associated proteins are restored by LRGT in the hippocampus from hyperhomocysteinemic rats [17], and cAMP/PKA pathway is also improved [14, 34]. Additionally, LRGT not only attenuates neural loss and degeneration, but it also increases neurogenesis in the cortex [18, 23, 26, 35] and the subventricular zone [31, 32], reduces the number of degenerating cells in the cortex and hippocampus [12], and increases cell proliferation in the dentate gyrus of AD animals [26]. Inflammation is also a major feature in AD and previous studies show

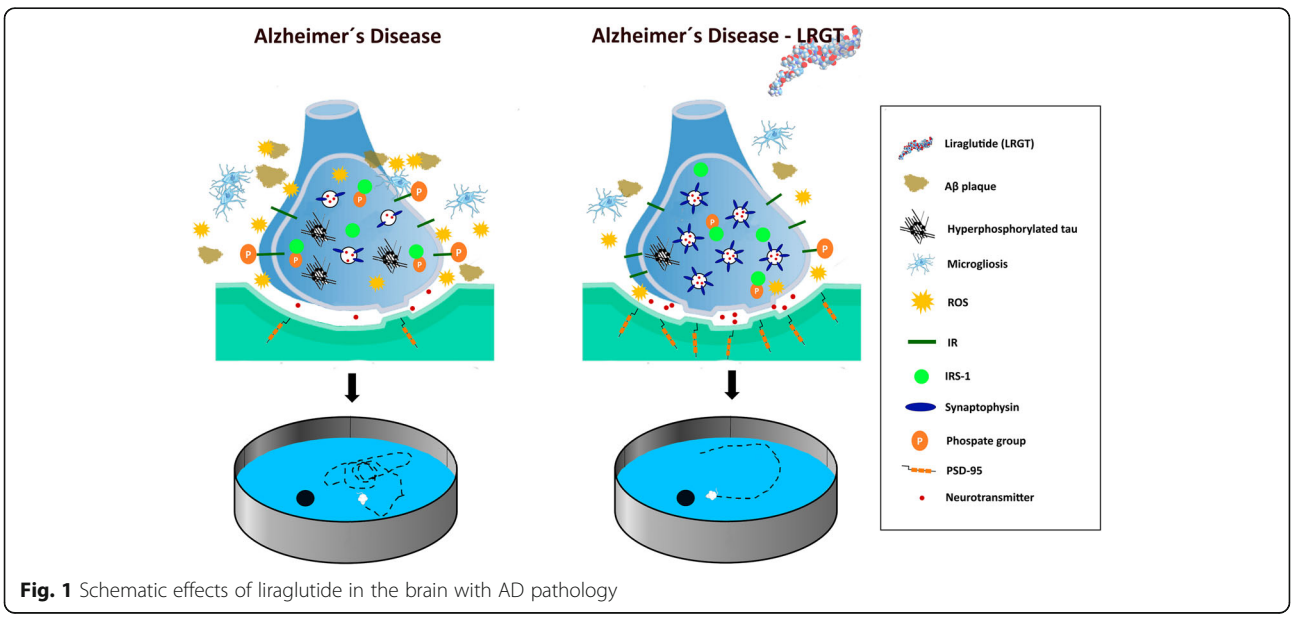


Fig. 1 Schematic effects of liraglutide in the brain with AD pathology

that LRGT reduces microgliosis and astrocytosis in the cortex [19, 23, 30, 35] and hippocampus [29, 31, 32]. Besides, LRGT limits pro-inflammatory cytokines, including TNF-α, IL-1ß, or IL-10 [13, 24]. In line with these observations, LRGT also decreases brain oxidative stress, by reducing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, the formation of cortical carbonyl groups, nitrite and 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine in 3xTgAD mice [13]. Similarly, oxidative phosphorylation of cortical astrocytes is reduced in 5xFAD mice [27] (Fig. 1).

The positive effects of LRGT on AD-like pathology support the beneficial role of LRGT on learning and memory in most of the studies. In this sense, spatial working memory improves after LRGT treatment [12, 15, 17, 18, 24], and LRGT also restores episodic memory in AD models [14, 18, 23] (Fig. 1). In line with these observations, contextual fear conditioning [14], active-avoidance T-maze task [25], or clasping behavior [33] are also improved by LRGT, while locomotor activity does not seem affected [12, 17, 23].

Studies in AD patients

The above described outcomes in preclinical models of AD have set the basis to futher assess LRGT in patients. Whereas other antidiabetic drugs, including GLP-1 analogs or dipeptidyl peptidase 4 inhibitors, have been part of preceding or ongoing clinical trials, studies with LRGT specifically are still limited. Previous meta-analysis has shown a pro-cognitive class effect of antidiabetic agents in AD/mild cognitive impairment, although the actual beneficial effects with LRGT are limited [36]. LRGT administration to individuals with subjective cognitive complaints, at risk for AD, improves intrinsic connectivity within brain areas. While this did not translate into cognitive differences between study groups after 12 weeks of treatment [37], other studies have shown that treatment with LRGT to AD patients for 6 months raises blood-brain glucose transfer capacity, restoring glucose transport [38], as an initial requirement to improve brain alterations. Gejl et al. [39] (ClinicalTrials.gov NCT01469351) have also reported that treatment with LRGT to AD patients for 6 months prevents cerebral metabolic rate of glucose consumption decline, as an indicator of cognitive impairment, synaptic dysfunction, and disease evolution. Whereas Aβ load or cognition do not seem to be affected, the authors state the study was underpowered. Another study with pre- or early diabetes patients has recently shown that LRGT improves short-term memory and memory composite in treated patients [40]. The ELAD trial is presently ongoing and the main objectives include evaluation of glucose metabolic consumption in cortical regions and cognition, MRI changes, microglial activation, and amyloid or tau changes [41], and the latest results will be published shortly.

Conclusions

Preclinical studies show beneficial effects of LRGT on AD pathological features and cognition. While the studies in patients have only shown moderate positive effects, the ongoing ELAD trial may provide relevant insights on the actual role of LRGT at central level and open new venues of treatment for AD patients.

Abbreviations

Aβ: Amyloid-β; AD: Alzheimer's disease; T2D: Type 2 diabetes; GLP-1: Glucagon-like peptide 1; LRGT: Liraglutide

Acknowledgements

Not applicable

Authors' contributions

MVS and MJCN drafted the manuscript. ADM and MGA drafted parts of the manuscript and revised and completed the manuscript. The authors read and approved the final manuscript.

Funding

MG-A: Programa Estatal de I+D+I orientada a los Retos de la Sociedad (BFU 2016-75038-R), financed by the Agencia Estatal de Investigación (AEI) and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Explora Ciencia. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (BFU2017-91910-EXP). Subvención para la financiación de la investigación y la innovación biomédica y en ciencias de la salud en el marco de la iniciativa territorial integrada 2014-2020 para la provincia de Cádiz. Consejeria de Salud. Junta de Andalucía. Unión Europea, financed by the Fondo de Desarrollo Regional (FEDER) (PI-0008-2017).

Availability of data and materials

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

[1]Division of Physiology, School of Medicine, Instituto de Investigacion Biomedica de Cadiz (INIBICA), Universidad de Cadiz, Edificio Andres Segovia, C/Dr. Maranon 3, 3er piso, Cadiz, Spain. [2]Salus Infirmorum-Universidad de Cadiz, Cadiz, Spain.

Received: 21 May 2021 Accepted: 31 May 2021
Published online: 12 June 2021

References

1. Sims-Robinson C, Kim B, Rosko A, Feldman EL. How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? Nat Rev Neurol. 2010;6(10):551–9. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.130.
2. Ryu JC, Zimmer ER, Rosa-Neto P, Yoon SO. Consequences of metabolic disruption in Alzheimer's disease pathology. Neurotherapeutics. 2019;16(3):600–10. https://doi.org/10.1007/s13311-019-00755-y.
3. Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang HY, Ahima RS, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer

disease: concepts and conundrums. Nat Rev Neurol. 2018;14(3):168–81. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.185.
4. Biessels GJ, Despa F. Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications. Nat Rev Endocrinol. 2018;14(10):591–604. https://doi.org/10.1038/s41574-018-0048-7.
5. Wang KC, Woung LC, Tsai MT, Liu CC, Su YH, Li CY. Risk of Alzheimer's disease in relation to diabetes: a population-based cohort study. Neuroepidemiology. 2012;38(4):237–44. https://doi.org/10.1159/000337428.
6. Huang CC, Chung CM, Leu HB, Lin LY, Chiu CC, Hsu CY, et al. Diabetes mellitus and the risk of Alzheimer's disease: a nationwide population-based study. PLoS One. 2014;9(1):e87095. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087095.
7. Timper K, Del Rio-Martin A, Cremer AL, Bremser S, Alber J, Giavalisco P, et al. GLP-1 Receptor signaling in astrocytes regulates fatty acid oxidation, mitochondrial integrity, and function. Cell Metab. 2020;31(6):1189–205 e13. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.05.001.
8. Katsurada K, Yada T. Neural effects of gut- and brain-derived glucagon-like peptide-1 and its receptor agonist. J Diabetes Investig. 2016;7(Suppl 1):64–9. https://doi.org/10.1111/jdi.12464.
9. Grieco M, Giorgi A, Gentile MC, d'Erme M, Morano S, Maras B, et al. Glucagon-like peptide-1: a focus on neurodegenerative diseases. Front Neurosci. 2019;13:1112. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01112.
10. Chatterjee S, Mudher A. Alzheimer's disease and type 2 diabetes: a critical assessment of the shared pathological traits. Front Neurosci. 2018;12:383. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00383.
11. Wicinski M, Socha M, Malinowski B, Wodkiewicz E, Walczak M, Gorski K, et al. Liraglutide and its neuroprotective properties-focus on possible biochemical mechanisms in alzheimer's disease and cerebral ischemic events. Int J Mol Sci. 2019;20(5).
12. Chen S, Sun J, Zhao G, Guo A, Chen Y, Fu R, et al. Liraglutide improves water maze learning and memory performance while reduces hyperphosphorylation of tau and neurofilaments in APP/PS1/Tau triple transgenic mice. Neurochem Res. 2017;42(8):2326–35. https://doi.org/10.1007/s11064-017-2250-8.
13. Duarte AI, Candeias E, Alves IN, Mena D, Silva DF, Machado NJ, et al. Liraglutide protects against brain amyloid-beta1-42 accumulation in female mice with early Alzheimer's disease-like pathology by partially rescuing oxidative/nitrosative stress and inflammation. Int J Mol Sci. 2020;21(5).
14. Batista AF, Forny-Germano L, Clarke JR, Lyra ESNM, Brito-Moreira J, Boehnke SE, et al. The diabetes drug liraglutide reverses cognitive impairment in mice and attenuates insulin receptor and synaptic pathology in a non-human primate model of Alzheimer's disease. J Pathol. 2018;245(1):85–100. https://doi.org/10.1002/path.5056.
15. Qi L, Ke L, Liu X, Liao L, Ke S, Liu X, et al. Subcutaneous administration of liraglutide ameliorates learning and memory impairment by modulating tau hyperphosphorylation via the glycogen synthase kinase-3beta pathway in an amyloid beta protein induced Alzheimer disease mouse model. Eur J Pharmacol. 2016;783:23–32. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.052.
16. Qi L, Chen Z, Wang Y, Liu X, Liu X, Ke L, et al. Subcutaneous liraglutide ameliorates methylglyoxal-induced Alzheimer-like tau pathology and cognitive impairment by modulating tau hyperphosphorylation and glycogen synthase kinase-3beta. Am J Transl Res. 2017;9(2):247–60.
17. Zhang Y, Xie JZ, Xu XY, Hu J, Xu T, Jin S, et al. Liraglutide ameliorates hyperhomocysteinemia-induced Alzheimer-like pathology and memory deficits in rats via multi-molecular targeting. Neurosci Bull. 2019;35(4):724–34. https://doi.org/10.1007/s12264-018-00336-7.
18. McClean PL, Holscher C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. Neuropharmacology. 2014;76(Pt A):57–67.
19. Long-Smith CM, Manning S, McClean PL, Coakley MF, O'Halloran DJ, Holscher C, et al. The diabetes drug liraglutide ameliorates aberrant insulin receptor localisation and signalling in parallel with decreasing both amyloid-beta plaque and glial pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. NeuroMolecular Med. 2013;15(1):102–14. https://doi.org/10.1007/s12017-012-8199-5.
20. Paladugu L, Gharaibeh A, Kolli N, Learman C, Hall TC, Li L, et al. Liraglutide has anti-inflammatory and anti-amyloid properties in streptozotocin-induced and 5xFAD mouse models of Alzheimer's disease. Int J Mol Sci. 2021;22(2).
21. Kulas JA, Franklin WF, Smith NA, Manocha GD, Puig KL, Nagamoto-Combs K, et al. Ablation of amyloid precursor protein increases insulin-degrading enzyme levels and activity in brain and peripheral tissues. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2019;316(1):E106–E20. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00279.2018.
22. Li H, Wu J, Zhu L, Sha L, Yang S, Wei J, et al. Insulin degrading enzyme contributes to the pathology in a mixed model of type 2 diabetes and Alzheimer's disease: possible mechanisms of IDE in T2D and AD. Biosci Rep. 2018;38(1).
23. McClean PL, Jalewa J, Holscher C. Prophylactic liraglutide treatment prevents amyloid plaque deposition, chronic inflammation and memory impairment in APP/PS1 mice. Behav Brain Res. 2015;293:96–106. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.024.
24. Maskery M, Goulding EM, Gengler S, Melchiorsen JU, Rosenkilde MM, Holscher C. The dual GLP-1/GIP receptor agonist DA4-JC shows superior protective properties compared to the GLP-1 analogue liraglutide in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. Am J Alzheimers Dis Other Dement. 2020;35:1533317520953041.
25. Hansen HH, Fabricius K, Barkholt P, Niehoff ML, Morley JE, Jelsing J, et al. The GLP-1 receptor agonist liraglutide improves memory function and increases hippocampal CA1 neuronal numbers in a senescence-accelerated mouse model of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2015;46(4):877–88. https://doi.org/10.3233/JAD-143090.
26. Parthsarathy V, Holscher C. Chronic treatment with the GLP1 analogue liraglutide increases cell proliferation and differentiation into neurons in an AD mouse model. PLoS One. 2013;8(3):e58784. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058784.
27. Zheng J, Xie Y, Ren L, Qi L, Wu L, Pan X, et al. GLP-1 improves the supportive ability of astrocytes to neurons by promoting aerobic glycolysis in Alzheimer's disease. Mol Metab. 2021;47:101180. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101180.
28. Hansen HH, Fabricius K, Barkholt P, Kongsbak-Wismann P, Schlumberger C, Jelsing J, et al. Long-term treatment with liraglutide, a glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist, has no effect on beta-amyloid plaque load in two transgenic APP/PS1 mouse models of Alzheimer's disease. PLoS One. 2016;11(7):e0158205. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158205.
29. Holubova M, Hruba L, Popelova A, Bencze M, Prazienkova V, Gengler S, et al. Liraglutide and a lipidized analog of prolactin-releasing peptide show neuroprotective effects in a mouse model of beta-amyloid pathology. Neuropharmacology. 2019;144:377–87. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.002.
30. McClean PL, Parthsarathy V, Faivre E, Holscher C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. J Neurosci. 2011;31(17):6587–94. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0529-11.2011.
31. Salles GN, Calio ML, Holscher C, Pacheco-Soares C, Porcionatto M, Lobo AO. Neuroprotective and restorative properties of the GLP-1/GIP dual agonist DA-JC1 compared with a GLP-1 single agonist in Alzheimer's disease. Neuropharmacology. 2020;162:107813. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107813.
32. Salles GN, Calio ML, Afewerki S, Pacheco-Soares C, Porcionatto M, Holscher C, et al. Prolonged drug-releasing fibers attenuate Alzheimer's disease-like pathogenesis. ACS Appl Mater Interfaces. 2018;10(43):36693–702. https://doi.org/10.1021/acsami.8b12649.
33. Hansen HH, Barkholt P, Fabricius K, Jelsing J, Terwel D, Pyke C, et al. The GLP-1 receptor agonist liraglutide reduces pathology-specific tau phosphorylation and improves motor function in a transgenic hTauP301L mouse model of tauopathy. Brain Res. 2016;1634:158–70.
34. Han WN, Holscher C, Yuan L, Yang W, Wang XH, Wu MN, et al. Liraglutide protects against amyloid-beta protein-induced impairment of spatial learning and memory in rats. Neurobiol Aging. 2013;34(2):576–88. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.04.009.
35. McClean PL, Holscher C. Lixisenatide, a drug developed to treat type 2 diabetes, shows neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuropharmacology. 2014;86:241–58. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.07.015.
36. Cao B, Rosenblat JD, Brietzke E, Park C, Lee Y, Musial N, et al. Comparative efficacy and acceptability of antidiabetic agents for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic review and network meta-analysis. Diabetes Obes Metab. 2018;20(10):2467–71. https://doi.org/10.1111/dom.13373.
37. Watson KT, Wroolie TE, Tong G, Foland-Ross LC, Frangou S, Singh M, et al. Neural correlates of liraglutide effects in persons at risk for Alzheimer's

disease. Behav Brain Res. 2019;356:271–8. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.08.006.
38. Gejl M, Brock B, Egefjord L, Vang K, Rungby J, Gjedde A. Blood-brain glucose transfer in Alzheimer's disease: effect of GLP-1 analog treatment. Sci Rep. 2017;7(1):17490. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17718-y.
39. Gejl M, Gjedde A, Egefjord L, Moller A, Hansen SB, Vang K, et al. In Alzheimer's disease, 6-month treatment with GLP-1 analog prevents decline of brain glucose metabolism: randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. Front Aging Neurosci. 2016;8:108.
40. Vadini F, Simeone PG, Boccatonda A, Guagnano MT, Liani R, Tripaldi R, et al. Liraglutide improves memory in obese patients with prediabetes or early type 2 diabetes: a randomized, controlled study. Int J Obes. 2020;44(6):1254–63. https://doi.org/10.1038/s41366-020-0535-5.
41. Femminella GD, Frangou E, Love SB, Busza G, Holmes C, Ritchie C, et al. Evaluating the effects of the novel GLP-1 analogue liraglutide in Alzheimer's disease: study protocol for a randomised controlled trial (ELAD study). Trials. 2019;20(1):191. https://doi.org/10.1186/s13063-019-3259-x.

Publisher's Note

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

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

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

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



ANEXO 2. OTRAS PUBLICACIONES ORIGINALES NO INCLUIDAS EN ESTE TRABAJO

1.- Little K., Llorián-Salvador M., Scullion S., Hernández C., Simó-Servat O., del Marco A., Bosma E., Vargas-Soria M., **Carranza-Naval MJ.,** Van Bergen T., Galbiati S., Viganò I., Musi CA., Schlingemann R., Feyen J., Borsello T., Zerbini G., Klaassen I., Garcia-Alloza M., Simó R., Stitt AW.; RECOGNISED consortium (GA 847749). Common pathways in dementia and diabetic retinopathy: understanding the mechanisms of diabetes-related cognitive decline. Trends Endocrinol Metab. 2022 Jan;33(1):50-71. doi: 10.1016/j.tem.2021.10.008. Epub 2021 Nov 15. ***FI. 12.015***

2.- **Carranza-Naval MJ.*,** Vargas-Soria M.*, Hierro-Bujalance C., Baena-Nieto G., Garcia-Alloza M., Infante-Garcia C., del Marco A. Alzheimer's Disease and Diabetes: Role of Diet, Microbiota and Inflammation in Preclinical Models. Biomolecules. 2021 Feb 10;11(2):262. doi: 10.3390/biom11020262. **igual contribución.* ***FI. 4.57***

3.- Hierro-Bujalance C., Infante-Garcia C., de Marco M., Herrera M., **Carranza-Naval MJ.**, Suarez J., Alves-Martinez P., Lubian-Lopez S., Garcia-Alloza M. Empagliflozin ameliorates brain pathology in a mixed murine model of type 2 diabetes and Alzheimer´s disease. Alzheimers Res Ther 2020 Apr 7;12(1):40. doi: 10.1186/s13195-020-00607-4. ***FI. 6.28***

ANEXO 3. OTROS TRABAJOS

3.1 Comunicaciones orales a Congresos Internacionales

1.- **Carranza-Naval MJ.,** del Marco A., Hierro-Bujalance C., Infante-Garcia C., Garcia-Alloza M. Liraglutide reduces amyloid pathology and microglia activation in a mixed murine model of Alzheimer´s disease and type 2 diabetes. AD/PD meeting. Online. 2021.

3.2 Comunicaciones a Congresos Internacionales (pósters)

1.- **Carranza-Naval MJ.,** Hierro-Bujalance C., Barbara-Cordoba B., Herrera-Jimenez M., Garcia-Alloza M. "Liraglutide improves metabolic alterations and cognitive impairment in a mixed murine model of Alzheimer´s disease and type two diabetes". AD/PD meeting 2019, Lisboa. Portugal.

2.- **Carranza-Naval MJ.*,** Infante-Garcia C.*, Pickett E., Jackson R., Spires-Jones T., Garcia-Alloza M. Antidibetic treatment reduces synaptic loss in a murine model of AD and type 2 diabetes without affecting amyloid-beta levels. AD/PD meeting 2019, Lisboa. Portugal. **Igual contribución.*

3.- Hierro-Bujalance C., Herrera-Jimenez M., **Carranza-Naval MJ.**, Garcia-Alloza M. Empagliflozin reduces cognitive impairment and spontaneous central bleeding in a mixed model of AD and type 2 diabetes. AD/PD meeting 2019, Lisboa. Portugal.

4.- **Carranza-Naval MJ.,** Infante-Garcia C., Ramos-Rodriguez JJ., Hierro-Bujalance C., Pickett E., Jackson R., Spires-Jones T., Garcia-Alloza M. "Antidiabetic polypill reduces brain atrophy and synaptic loss in a mixed murine model of Alzheimer's disease and type 2 diabetes". FENS 2018, Berlín. Alemania.

5.- Hierro-Bujalance C., Ramos-Rodriguez JJ., Infante-Garcia C., Gomez-Santos SB., **Carranza-Naval MJ.,** Casado-Revuelta A., Garcia-Alloza M. Brain proliferation and neurogenesis are impaired in murine mixed models of Alzheimer´s disease and diabetes mellitus. Forum for European Neurosciences. FENS 2018, Berlín. Alemania.

6.- **Carranza-Naval MJ.,** Hierro-Bujalance C., Ramos-Rodriguez JJ., Casado-Revuelta A., Garcia-Alloza M. "Role of liraglutide on metabolic control and cognitive impairment in a murine model of type 2 diabetes and Alzheimer´s disease". SECF 2018, Cádiz. España.

7.- Hierro-Bujalance C., Ramos-Rodriguez JJ., Infante-Garcia C., **Carranza-Naval MJ.,** Casado-Revuelta A., Garcia-Alloza M. Empagliflozin improves cognitive impairment in a mixed murine model of Alzheimer´s disease and type 2 diabetes. SECF 2018, Cádiz. España.

3.3 Trabajos en revisión para su publicación

1.- Vargas-Soria M.*, Ramos-Rodriguez JJ.*, del Marco A., Hierro-Bujalance C., **Carranza-Naval MJ.,** Calvo-Rodriguez M., van Veluw SJ., Stitt AW., Simó R., Bacskai BJ., Infante-Garcia C.*, Garcia-Alloza M.*. **igual contribución.* Accelerated amyloid angiopathy and related vascular alterations in a mixed murine model of Alzheimer´s disease and type two diabetes. 2022. (Enviado).

2.- Alves-Martinez P., Isabel Atienza-Navarro I., Vargas-Soria M., **Carranza-Naval MJ.,** Infante-García C., Benavente-Fernandez I., del Marco A., Lubian-Lopez S.*, Garcia-Alloza M.*. *igual contribución. Caffeine restores neuronal damage and inflammatory response in a model of intraventricular hemorrhage of the preterm newborn. 2022. (Enviado).

ANEXO 4. VISTO BUENO DEL ÓRGANO HABILITADO

UCA Universidad de Cádiz

Vicerrectorado de Investigación

Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA)

Edificio Andrés Segovia
C/ Dr. Marañón, nº 3
11002 – CADIZ
Tel. 956015315. Fax: 956015331
ceea@uca.es

INFORME DEL ORGANO HABILITADO ***(Art. 34 del RD 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia)***

D. Carlos Costela Villodres, como secretario del Comité de Ética de Experimentación Animal - Órgano Habilitado de la Universidad de Cádiz,

DECLARA:

1. Que el siguiente proyecto (título): **Enfermedad de Alzheimer, demencia vascular y diabetes mellitus tipo 2: interrelación y consideraciones terapéuticas**

2. Que tiene una duración de (años y meses): **5 años**

3. Que está realizado por (datos del investigador principal o persona responsable):
   Apellidos: **García Alloza** Nombre: **Mónica**
   Categoría/s (según RD 1201/2005): ☐ A ■ B ■ C ☐ D1 ☐ D2
   Fecha/s de acreditación: **B: 17/05/2013; C: 08/07/2013**
   Centro/Facultad/Empresa: **Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz**
   Departamento: **Biomedicina, biotecnología y salud pública**
   Dirección: **Plaza Fragela, 9**
   Ciudad: **Cádiz** Código Postal: **11002**
   Tfno.: **956015252** Fax: E-mail: **monica.garcia@uca.es**

4. Que ha sido evaluado con un nivel de detalle apropiado al tipo de proyecto y la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los siguientes requisitos de acuerdo al artículo 34 del RD 53/2013:
   a) Está justificado desde el punto de vista científico o educativo, o debe realizarse por imposición legal o reglamentaria
   b) Su finalidad justifica la utilización de animales; y
   c) Está diseñado de manera que los procedimientos se realicen de forma más humanitaria y respetuosa con el medio ambiente que sea posible

5. Que ha sido revisado basándose en las reuniones internas desarrolladas por el Órgano Habilitado de la Universidad de Cádiz en las siguientes fechas: **31 de mayo de 2016**

6. Que el proceso de evaluación ha sido transparente, se ha realizado de modo imparcial, pudiendo integrar la opinión de partes independientes (según el apartado 3 del artículo 34 del RD 53/2013).

7. Que ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación del mismo.

8. Que basándose en la documentación presentada por el investigador responsable se ha realizado la siguiente **EVALUACIÓN**:
   a) Evaluación de su finalidad, de los beneficios científicos que se prevén alcanzar o de su valor docente
      Adecuado
   b) Evaluación de su conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento
      Adecuado
   c) Evaluación y clasificación de sus procedimientos en función del grado de severidad
      Procedimiento nº 1: Sacrificio con pentobarbital
      ■ Sin recuperación ☐ Leve ☐ Moderado ☐ Severo

Procedimiento nº 2: Marcaje
☐ Sin recuperación ■ Leve ☐ Moderado ☐ Severo
Procedimiento nº 3: Determinación marcadores metabólicos
☐ Sin recuperación ■ Leve ☐ Moderado ☐ Severo
Procedimiento nº 4: Implantación de ventanas craneales
☐ Sin recuperación ☐ Leve ■ Moderado ☐ Severo

d) Análisis de los daños y beneficios, para determinar si los daños, el sufrimiento, el dolor y la angustia que se les puedan causar a los animales están justificados por los resultados esperados, teniendo en cuenta consideraciones éticas y los beneficios que, en definitiva, pueda suponer el proyecto para los seres humanos, los animales o el medio ambiente
Adecuado

e) Examen de las situaciones y excepciones previstas en los artículos 6, 7, 9.1, 19, 20, 21, 22, 23, 25.3, 25.5, 26 y 29 del RD 53/2013
■ No existen
☐ Si existen Situaciones y/o excepciones:

f) Determinación de si el proyecto debe evaluarse de forma retrospectiva y, en su caso, cuando debería realizarse
■ No es necesaria evaluación retrospectiva del Proyecto
☐ Es necesaria evaluación retrospectiva del Proyecto:
Motivación de la necesidad de evaluación retrospectiva (en su caso):
Periodo de realización de la evaluación retrospectiva (en su caso):
Documentación necesaria para la evaluación retrospectiva (en su caso):
a) Grado de consecución de los objetivos
b) Evaluación del daño infligido a los animales, incluido el número y las especies de animales utilizados, y la severidad de los procedimientos
c) Cualquiera de los elementos que puedan contribuir a una mejor aplicación del requisito de reemplazo, reducción y refinamiento

CONFIRMA:

1. Que el proyecto ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación del mismo.

2. Que el proyecto sometido a este informe del Órgano Habilitado, por lo anteriormente expuesto, se clasifica como:
☐ Proyecto tipo I ■ Proyecto tipo II ☐ Proyecto tipo III

3. Que la evaluación del proyecto sometido a este Informe del Órgano Habilitado, resulta ser:
■ Favorable
☐ Desfavorable
☐ Favorable condicionado a la subsanación de defectos formales o a la aportación de la documentación adicional expresamente solicitada
Observaciones:

4. Que este documento tiene una vigencia máxima de 5 años.

Cádiz, 31 de mayo de 2016

Fdo: Carlos Costela Villodres
Secretario del CEEA – Órgano Habilitado

Fdo: Casimiro Mantell Serrano
Vicerrector de Investigación
Presidente del CEEA – Órgano Habilitado

Página 2 de 2

UCA Universidad de Cádiz

Vicerrectorado de Política Científica y Tecnológica

Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA)

Edificio Andrés Segovia
C/ Dr. Marañón, nº 3
11002 – CADIZ
Tel. 956015315. Fax: 956015331
ceea@uca.es

INFORME CONJUNTO DEL ORGANO HABILITADO Y DEL OEBA-CEEA ***(Art. 34 y 38 del RD 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia)***

D. Carlos Costela Villodres, como secretario del Comité de Ética de Experimentación Animal - Órgano Habilitado de la Universidad de Cádiz,

DECLARA:

1. Que el siguiente proyecto (título): **Complicaciones tempranas en la enfermedad de Alzheimer y en diabetes mellitus tipo 2: implicaciones farmacológicas (Early crosstalk in Alzheimer's disease and type 2 diabetes: pharmacological implications (ERALDIPHAR))**

2. Que tiene una duración de (años y meses): **5 años**

3. Que está realizado por (datos del investigador principal o persona responsable):
   Apellidos: **García Alloza** Nombre: **Mónica**
   Categoría/s (según RD 1201/2005): ☐ A ■ B ■ C ☐ D1 ☐ D2
   Fecha/s de acreditación: **B: 17/05/2013; C: 08/07/2013**
   Centro/Facultad/Empresa: **Facultad de Medicina**
   Departamento: **Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública**
   Dirección: **Plaza Fragela, 9**
   Ciudad: **Cádiz** Código Postal: **11003**
   Tfno.: **956015252** Fax: E-mail: **monica.garcia@uca.es**

4. Que ha sido evaluado con un nivel de detalle apropiado al tipo de proyecto y la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los siguientes requisitos de acuerdo al artículo 34 del RD 53/2013:
   a) Está justificado desde el punto de vista científico o educativo, o debe realizarse por imposición legal o reglamentaria
   b) Su finalidad justifica la utilización de animales; y
   c) Está diseñado de manera que los procedimientos se realicen de forma más humanitaria y respetuosa con el medio ambiente que sea posible

5. Que ha sido revisado basándose en las reuniones internas desarrolladas por el Órgano Habilitado de la Universidad de Cádiz en las siguientes fechas: **28 de enero de 2021**

6. Que el proceso de evaluación ha sido transparente, se ha realizado de modo imparcial, pudiendo integrar la opinión de partes independientes (según el apartado 3 del artículo 34 del RD 53/2013).

7. Que ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación del mismo.

8. Que basándose en la documentación presentada por el investigador responsable se ha realizado la siguiente **EVALUACIÓN**:
   a) Evaluación de su finalidad, de los beneficios científicos que se prevén alcanzar o de su valor docente
      Adecuado

   b) Evaluación de su conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento
      Adecuado

Código Seguro de verificación: NKTkdq4Zjy3UJvU2bAEtVw==. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección: https://verificarfirma.uca.es
Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.

FIRMADO POR	MARIA JESUS MOSQUERA DIAZ		FECHA	29/01/2021
ID. FIRMA	angus.uca.es	NKTkdq4Zjy3UJvU2bAEtVw==	PÁGINA	1/3

NKTkdq4Zjy3UJvU2bAEtVw==

c) Evaluación y clasificación de sus procedimientos en función del grado de severidad

Procedimiento nº 1: Marcaje de animales
☐ Sin recuperación ■ Leve ☐ Moderado ☐ Severo

Procedimiento nº 2: Inoculación subcutánea
☐ Sin recuperación ■ Leve ☐ Moderado ☐ Severo

Procedimiento nº 3: Alimentación con dieta alta en grasas
☐ Sin recuperación ■ Leve ☐ Moderado ☐ Severo

Procedimiento nº 4: Extracción de muestras de sangre
☐ Sin recuperación ■ Leve ☐ Moderado ☐ Severo

Procedimiento nº 5: Obtención de muestras de heces
☐ Sin recuperación ■ Leve ☐ Moderado ☐ Severo

Procedimiento nº 6: Reconocimiento de nuevo objeto
☐ Sin recuperación ■ Leve ☐ Moderado ☐ Severo

Procedimiento nº 7: Laberinto acuático de Morris
☐ Sin recuperación ■ Leve ☐ Moderado ☐ Severo

Procedimiento nº 8: Inyección estereotáxica en corteza
☐ Sin recuperación ☐ Leve ■ Moderado ☐ Severo

Procedimiento nº 9: Implantación de ventanas craneales
☐ Sin recuperación ☐ Leve ■ Moderado ☐ Severo

Procedimiento nº 10: Estudios de neuroimagen bajo anestesia
☐ Sin recuperación ■ Leve ☐ Moderado ☐ Severo

Procedimiento nº 11: Electroretinografía
☐ Sin recuperación ■ Leve ☐ Moderado ☐ Severo

d) Análisis de los daños y beneficios, para determinar si los daños, el sufrimiento, el dolor y la angustia que se les puedan causar a los animales están justificados por los resultados esperados, teniendo en cuenta consideraciones éticas y los beneficios que, en definitiva, pueda suponer el proyecto para los seres humanos, los animales o el medio ambiente

Adecuado

e) Examen de las situaciones y excepciones previstas en los artículos 6, 7, 9.1, 19, 20, 21, 22, 23, 25.3, 25.5, 26 y 29 del RD 53/2013

■ No existen
☐ Si existen Situaciones y/o excepciones:

f) Determinación de si el proyecto debe evaluarse de forma retrospectiva y, en su caso, cuando debería realizarse

■ No es necesaria evaluación retrospectiva del Proyecto
☐ Es necesaria evaluación retrospectiva del Proyecto:
Motivación de la necesidad de evaluación retrospectiva (en su caso):
Periodo de realización de la evaluación retrospectiva (en su caso):
Documentación necesaria para la evaluación retrospectiva (en su caso):
a) Grado de consecución de los objetivos
b) Evaluación del daño infligido a los animales, incluido el número y las especies de animales utilizados, y la severidad de los procedimientos
c) Cualquiera de los elementos que puedan contribuir a una mejor aplicación del requisito de reemplazo, reducción y refinamiento

CONFIRMA:

1. Que el proyecto ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación del mismo.

2. Que el proyecto sometido a este informe del Órgano Habilitado, por lo anteriormente expuesto, se clasifica como:
☐ Proyecto tipo I ■ Proyecto tipo II ☐ Proyecto tipo III

Página 2 de 3

Código Seguro de verificación:NKTkdq4Ziy3UJvU2bAEtVw==. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección: https://verificarfirma.uca.es
Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.

FIRMADO POR	MARIA JESUS MOSQUERA DIAZ		FECHA	29/01/2021
ID. FIRMA	angus.uca.es	NKTkdq4Ziy3UJvU2bAEtVw==	PÁGINA	2/3

NKTkdq4Ziy3UJvU2bAEtVw==

3. Que la evaluación del proyecto sometido a este Informe del Órgano Habilitado, resulta ser:
   - [■] Favorable
   - [ ] Desfavorable
   - [ ] Favorable condicionado a la subsanación de defectos formales o a la aportación de la documentación adicional expresamente solicitada

   Observaciones:

4. Que este documento tiene una vigencia máxima de 5 años.

Cádiz, 28 de enero de 2021

Fdo: Carlos Gotelda Villodres
Secretario del CEEA – Órgano Habilitado

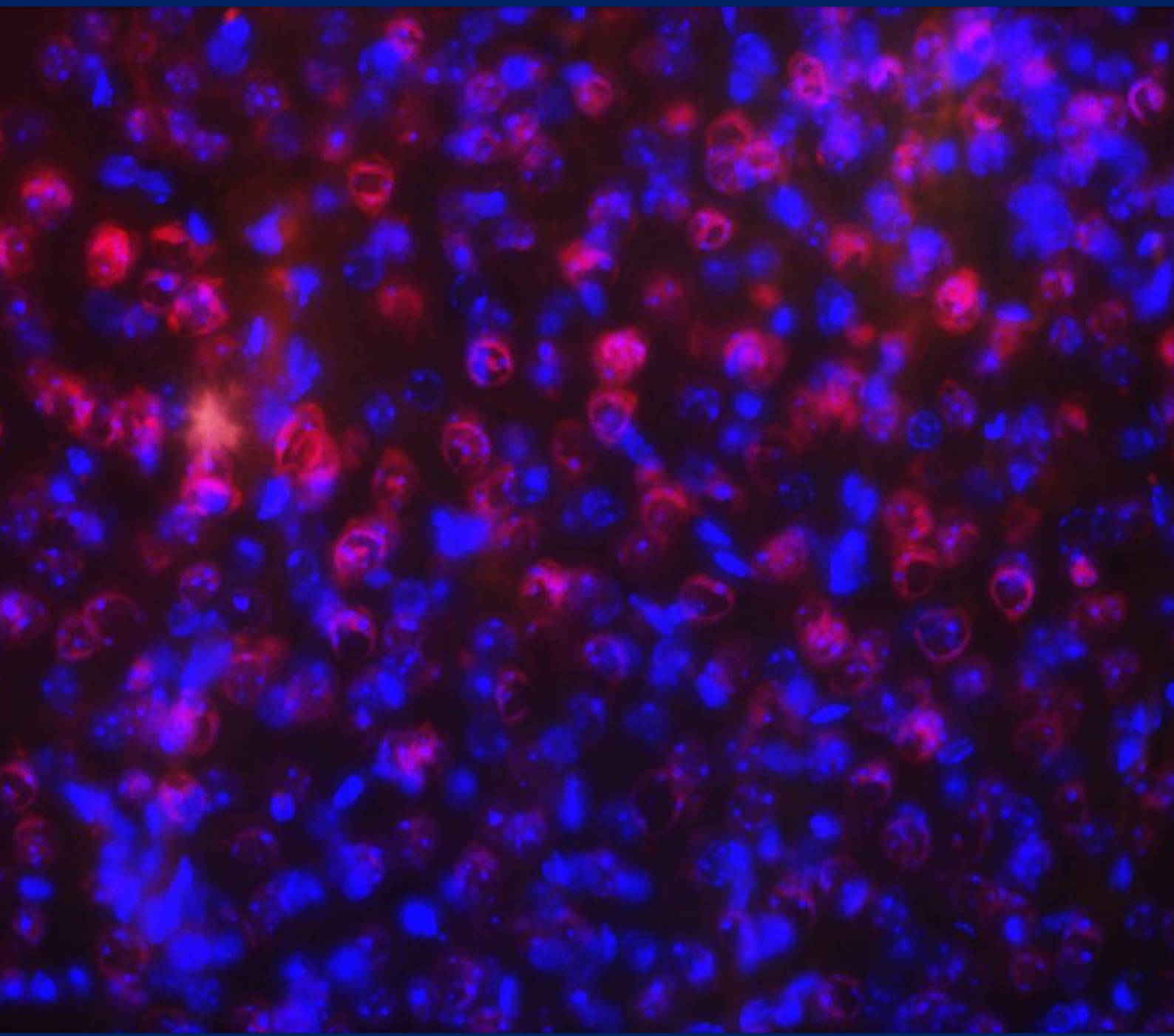
Fdo: María Jesús Mosquera Díaz
Vicerrectora de Política Científica y Tecnológica
Presidente del CEEA – Órgano Habilitado

Página 3 de 3

Código Seguro de verificación:NKTkdq42jy3UJvU2bAEtVw==. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección: https://verificarfirma.uca.es
Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.

FIRMADO POR	MARIA JESUS MOSQUERA DIAZ	FECHA	29/01/2021
ID. FIRMA	angus.uca.es NKTkdq42jy3UJvU2bAEtVw==	PÁGINA	3/3

NKTkdq42jy3UJvU2bAEtVw==



UCA
Universidad
de Cádiz