



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas
Tesis de Licenciatura

**Potencial rol protector de metformina sobre la
disfunción microglial en modelos experimentales
de la enfermedad de Alzheimer.**

Luciano Arcucci

Director: Dr. Carlos Javier Pomilio

Directora asistente: Dra. Flavia Eugenia Saravia

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica,
FCEyN, UBA e Instituto de Biología y Medicina Experimental,
CONICET

Buenos Aires, Abril 2024

Índice

Resumen	3
Abreviaturas	5
Introducción	6
Enfermedad de Alzheimer.....	7
Modelos animales.....	13
Metformina.....	15
Microglía.....	19
Autofagia.....	22
Objetivos e Hipótesis	26
Materiales y Métodos	28
Experimentos in vivo.....	29
Experimentos in vitro.....	34
Resultados	38
El tratamiento con metformina generó una mejora a nivel cognitivo y una tendencia a la reducción de la patología amiloide en un modelo murino de la EA.....	39
El tratamiento con metformina revierte el impacto de la EA sobre la microglía.....	42
Puesta a punto y selección de las condiciones para evaluar el efecto de metformina en células microgliales.....	45
Metformina revierte el aumento de ROS mitocondriales y el bloqueo del flujo autofágico causado por A β en células BV2.....	47
Discusión	51
Modelo de EA empleado.....	52
Efectos de metformina dependientes del sexo.....	53
Efectos de metformina dependientes de sus condiciones de administración.....	54
Efectos de metformina dependientes del tipo celular.....	56
Efectos de metformina sobre la autofagia microglial.....	58
Conclusión.....	60
Bibliografía	61

Potencial rol protector de metformina sobre la disfunción microglial en modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer.

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia, con gran impacto en individuos, sociedades y sistemas de salud. Esta enfermedad, producida en la mayoría de los casos de manera esporádica y sin causa conocida, impacta en el cerebro generando acumulación de placas seniles formadas por péptidos β -amiloide (A β), alteraciones en el metabolismo celular, y neuroinflamación crónica. Debido a la falta de un tratamiento eficaz contra la EA, y en el marco de la estrategia de reposicionamiento de drogas, en esta Tesis de Licenciatura se propone evaluar el potencial rol protector de metformina (MET) sobre la patología y la disfunción microglial, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* de la enfermedad. Para ello, se utilizaron ratones PDAPP-J20 de 9 meses de edad, un modelo validado de la enfermedad en etapa sintomática, los cuales recibieron tres inyecciones intraperitoneales de MET durante tres semanas, a una dosis de 240 mg/kg por inyección. El tratamiento produjo una mejora significativa en el desempeño cognitivo de los ratones, evaluado por el test de reconocimiento de la localización novedosa de un objeto, y una tendencia hacia una disminución de las placas amiloides evaluados mediante tinción con rojo Congo. A nivel histológico, MET indujo la recuperación del marcador de microglía homeostática Tmem19 en ratones transgénicos, y una normalización del flujo autofágico microglial.

Como modelo *in vitro* hemos empleado microglía murina BV2, con la cual se realizó una puesta a punto de las condiciones de exposición a A β , para modelizar la patología amiloide, y de metformina, para evaluar su posible efecto protector. Se realizaron ensayos de viabilidad por MTT y marcación con ioduro de propidio para establecer las condiciones de exposición que no generen muerte celular. Evaluamos además que esta condición de exposición a A β aumenta la producción de ROS mitocondriales y causa un bloqueo del flujo autofágico, lo cual se revierte por el tratamiento con MET.

En su conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con MET se encuentra asociado a un efecto protector en ratones de la cepa PDAPP-J20, impactando sobre células microgliales, lo cual tiene además, su correlato en un modelo *in vitro* de microglía expuesta a la patología amiloide. Estos resultados sientan la base por desarrollar una línea de investigación que profundice los mecanismos afectados en la microglía en esta enfermedad y el potencial terapéutico de este fármaco normoglucemiante.

Potential protective role of metformin on microglial dysfunction in experimental models of Alzheimer's disease.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the leading cause of dementia, significantly affecting individuals, societies, and healthcare systems. The cause of the sporadic form of this disease is unknown, however it affects the brain by generating the accumulation of amyloid plaques formed by amyloid- $\text{A}\beta$ peptides ($\text{A}\beta$), alterations in cellular metabolism, and activation of microglial cells, leading to chronic inflammatory responses. Due to the lack of an effective treatment for AD, and within the framework of drug repositioning strategy, the aim of this Thesis was to evaluate the potential protective role of metformin (MET) on the pathology and microglial dysfunction, employing both *in vivo* and *in vitro* models of AD. We employed 9-month-old PDAPP-J20 mice, a validated model of the disease in symptomatic stage. These mice received three intraperitoneal injections of 220 μL of 4% metformin over three weeks, equivalent to a dose of 240 mg/kg per injection. We found that MET significantly improves the cognitive performance of AD mice, as assessed by the novel object recognition test. Histochemistry analysis revealed that animals treated with MET show a tendency towards reducing the presence of amyloid plaques in the hippocampus. Additionally, it was observed that MET leads to a recovery of the homeostatic microglial marker Tmem19, and a normalization of microglial autophagic flux, evaluated by double immunofluorescence with the autophagosome marker p62.

Murine microglial cell line BV2 was employed as an *in vitro* model. Conditions for exposure to $\text{A}\beta$ were established to model amyloid pathology, and for MET to evaluate its protective effect. Viability assays by MTT and propidium iodide staining were used to establish exposure conditions that do not induce cell death. Furthermore, it was found that this condition of $\text{A}\beta$ exposure increases mitochondrial ROS production, as evidenced by Mitosox staining, which is reversed by treatment with MET.

Taken together, these results suggest that metformin treatment is associated with a protective effect in PDAPP-J20 mice, positively impacting on microglial cells. This finding is supported by an *in vitro* model of microglia exposed to amyloid pathology. These results lay the foundation for further research into the mechanisms affected in microglia in this disease and the therapeutic potential of metformin.

Abreviaturas

A β : Péptidos β -amiloide

AMPK: Kinasa dependiente de AMP

ApoE: Apolipoproteína E

APP: Proteína precursora amiloide

Baf-A1: Bafilomicina A1

BHE: Barrera hematoencefálica

DCL: Deterioro cognitivo leve

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

EA: Enfermedad de Alzheimer

NOL: *Novel Object Recognition*

MET: Metformina

mTOR: *Mammalian Target of Rapamycin*

SNC: Sistema nervioso central

Introducción

Introducción

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo caracterizado por un progresivo deterioro cognitivo, y es la principal causa de demencia en todo el mundo. La demencia es un término general utilizado para un grupo de síntomas caracterizados por dificultades en la memoria, el lenguaje, la resolución de problemas y otras habilidades mentales, en una magnitud tal que afectan la vida diaria del paciente (Alzheimer's 2023).

El principal factor de riesgo para la EA es la edad, ya que la prevalencia del deterioro cognitivo aumenta significativamente con la misma y la incidencia de la demencia aumenta marcadamente después de los 65 años (Wu, Beiser et al. 2017). Como la esperanza de vida global se encuentra en aumento, se estima que en 2050 la EA afectará aproximadamente a más de 100 millones de personas en todo el mundo (Figura 1), teniendo un impacto mayor en países con ingresos bajos y medios, como el nuestro (Haines 2018, Alzheimer's 2020).

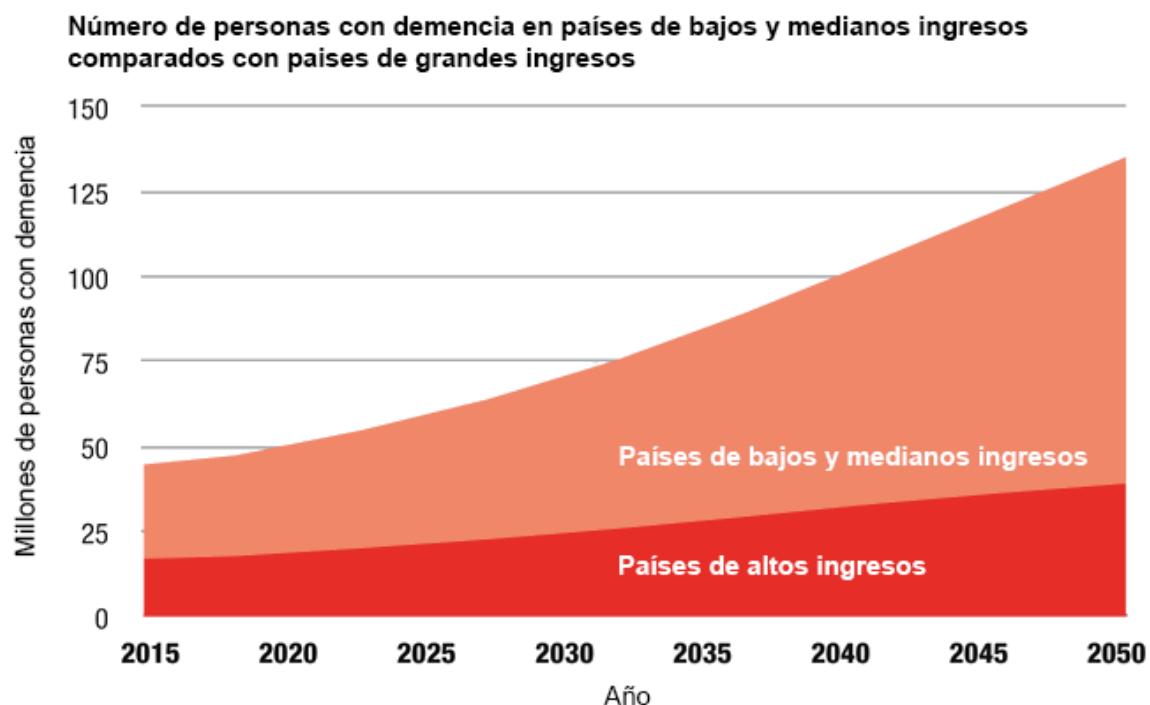


Figura 1. Número de personas con demencia en países de ingresos bajos y medios en comparación con los países de ingresos altos. Proyección mundial del número de personas con demencia hacia el año 2050. Adaptado de *World Alzheimer Report* (2015).

Existen dos formas de la EA. La forma familiar se desarrolla debido a mutaciones del gen que codifica para la proteína precursora del amiloide (APP), o para las proteínas presenilina 1 y 2, siendo todas ellas de carácter autosómico dominante (Bekris, Yu et al. 2010). Los síntomas de la EA familiar tienden a desarrollarse a edades más tempranas. Esta forma representa entre el 1 y el 5% de los casos de EA, mientras que el resto de los pacientes presentan la forma esporádica de la enfermedad, la cuál se desarrolla de manera tardía, después de los 65 años, y su causa es multifactorial.

Entre los factores que aumentan el riesgo de padecer EA esporádica, se encuentran los modificables y los no modificables. Entre los no modificables, el principal es la edad. Además, se encuentran algunos polimorfismos como la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (ApoE) (Saunders, Strittmatter et al. 1993). Por otro lado, existen factores de riesgo que sí son modificables, como la salud cardiovascular, el tabaquismo, la dieta, la educación, la actividad física, la actividad social y mental, y la calidad de sueño, entre otros (A Armstrong R. 2019).

La progresión de la EA puede caracterizarse dentro de tres fases, comenzando en un estadio preclínico que no evidencia síntomas cognitivos pero que acarrea cambios cerebrales que podrían ser detectables, continuando con una etapa de deterioro cognitivo leve (DCL) que no afecta la vida diaria, y avanzando hasta la demencia, la cual se agrava con el tiempo (Figura 2) (Sperling, Aisen et al. 2011).

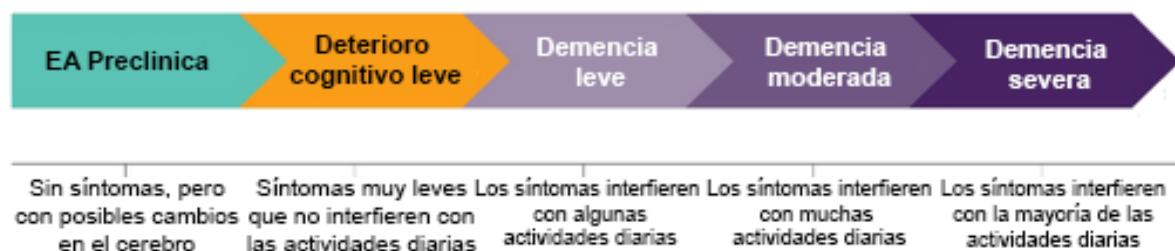


Figura 2. Etapas de la enfermedad de Alzheimer. Si bien las flechas mantienen tamaños iguales, los componentes de la progresividad de la enfermedad no son iguales en duración. Adaptado de *AD Facts and figures 2023* (Alzheimer's Association 2023).

La histopatología de la EA puede observarse de manera manifiesta mediante microscopía de cortes de cerebro en pacientes *post mortem*, evidenciándose ovillos neurofibrilares intraneuronales formados por agregados de proteína tau hiperfosforilada, placas seniles extracelulares que contienen agregados de la proteína β -Amiloide (A β), y glía activada, además de producirse atrofia debido a la neurodegeneración (Knopman, Amieva et al. 2021). La detección en el cerebro de placas amiloides y ovillos neurofibrilares mediante neuroimágenes o biomarcadores en líquido cefalorraquídeo es el principal diagnóstico que define a la EA y la diferencia de otras formas de demencia.

Los péptidos A β derivan del procesamiento de APP, una proteína transmembrana presente en las sinapsis neuronales. Durante su procesamiento, APP puede seguir dos vías que se diferencian por la enzima que la utiliza como sustrato y por los productos resultantes de las mismas (Figura 3). En la vía no amiloidogénica, APP es clivada por la enzima α -secretasa, generando APP α y α CTF, este último es luego clivado por la γ -secretasa para dar p3 y AICD. La vía amiloidogénica ocurre cuando APP es escindida inicialmente por la enzima β -secretasa, dando como producto β CTF, el cual es luego sustrato de la γ -secretasa para dar como producto péptidos A β (Thinakaran & Koo 2008; Knopman, Amieva et al. 2021). Tras su producción, A β se secreta en el espacio extracelular como monómeros, los cuales tienen entre 27 y 43 aminoácidos de longitud. Debido a su estructura secundaria abundante en hojas plegadas β , las formas de 40 o 42 aminoácidos de longitud (A β_{40} y A β_{42}) tienen una alta tendencia a agregarse, llegando a formar placas de fibrillas insolubles, las cuales consisten en agregados extracelulares neurotóxicos que alteran la homeostasis de células gliales y neuronas, facilitando la neurodegeneración (Ueda, Fukui et al. 1994; Silvers, Colvin et al. 2017).

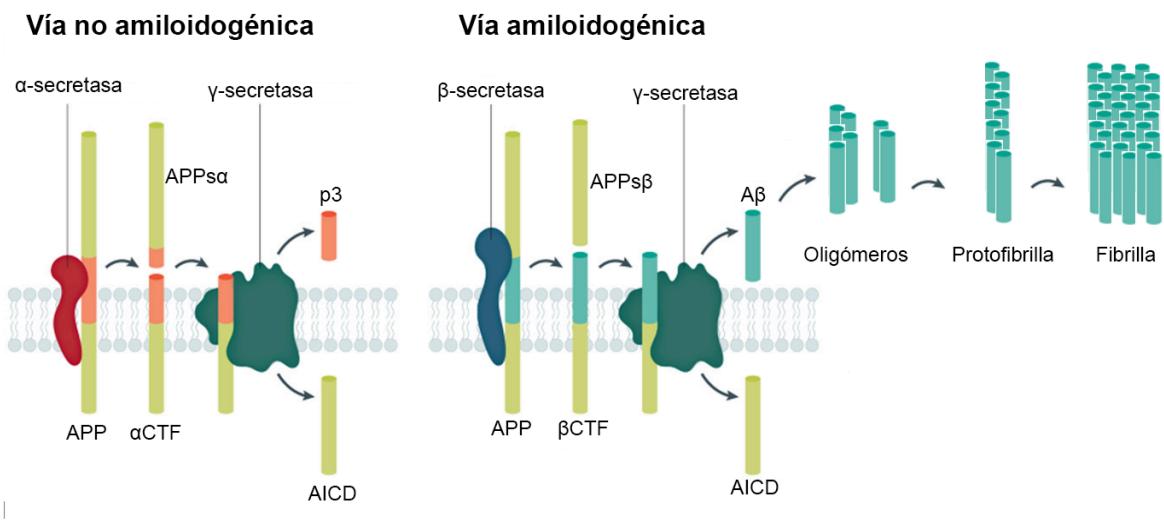


Figura 3. Vías de procesamiento de APP. (A) En la vía no amiloidogénica, la escisión sucesiva por las enzimas α -secretasa y γ -secretasa resulta en la producción de los péptidos p3 y AICD. El clivado de APP por las enzimas β -secretasa y γ -secretasa resulta en la formación de AICD y A β . Adaptado Knopman, Amieva *et al.* 2021.

Por otro lado, tau es una proteína asociada al citoesqueleto, presente en el soma celular, el citoplasma de los axones y en los compartimentos sinápticos. Su función principal es la estabilización de los microtúbulos. Esta proteína puede volverse propensa a modificaciones postraduccionales y a agregarse, acumulándose de forma hiperfosforilada en cuerpos celulares y dendritas, formando los ovillos neurofibrilares. Estos últimos consisten en agregados tóxicos que afectan el transporte axonal (Lacovich, Espindola *et al.* 2017; Gallardo & Holtzman 2019).

Una de las principales hipótesis que describe el desarrollo de la EA es la hipótesis de la cascada amiloide, la cual sostiene que la acumulación patológica de A β es el primer evento que desencadena, posteriormente, la formación de los ovillos neurofibrilares, causando finalmente la muerte neuronal (Hardy & Higgins 1992). Si bien durante las últimas décadas el foco principal para comprender y tratar la EA fue la patología amiloide, al día de hoy hay evidencias suficientes que sugieren cierta inconsistencia de esta hipótesis (Herrup 2015), por lo que

investigar otros factores que subyacen a la EA es fundamental para terminar de comprenderla.

La acumulación de proteínas dañadas y de agregados citotóxicos favorecen la formación de focos de estrés, por ende, es fundamental mantener la proteostasis para que A β y tau, entre otras proteínas, sean degradadas eficazmente. La producción de A β a través de la vía amiloidogénica se compensa con su posterior *clearance* o depurado, el cual puede ocurrir por diferentes procesos celulares, tales como la liberación de enzimas proteolíticas al medio extracelular, la internalización y degradación por parte de células gliales a través del sistema lisosomal, y la salida del tejido nervioso a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (Eckman & Eckman 2005; Zhao, Sagare et al. 2015; Cai, Wu et al. 2023).

Durante el desarrollo de la EA, una de las regiones del cerebro que más tempranamente se ve afectada es el hipocampo, observándose en él los primeros signos de acumulación depósitos amiloïdes, ovillos neurofibrilares y neurodegeneración, tanto en humanos como en modelos animales (Mufson, Mahady et al. 2015). El hipocampo forma parte del sistema límbico de los mamíferos, ubicándose en la parte medial del lóbulo temporal, y juega un rol importante en la memoria, la navegación y la cognición (Lisman, Buzsaki et al. 2017). Esta estructura se encuentra subdividida en el giro dentado, compuesto por neuronas granulares formando una doble hoja; y el Asta de Amón, compuesto por una capa compacta de neuronas piramidales que se subdividen funcionalmente en las regiones CA1, CA2, CA3 Y CA4 (Chauhan, Jethwa et al. 2021). En el giro dentado existe una región llamada hilio, la cual se encuentra entre las capas de células granulares y se caracteriza por ser particularmente sensible a los eventos patológicos que se producen en la EA (West 1993; Pomilio, Pavia et al. 2016). En el límite entre las neuronas granulares y el hilio se encuentra la zona subgranular, la cual es el lugar de residencia de las células progenitoras responsables del proceso de neurogénesis adulta, que desempeña un papel fundamental en el aprendizaje espacial, la formación de la memoria y la regulación del estado de ánimo (Zhao, Deng et al. 2008; Deng, Aimone et al. 2010) (Figura 4).

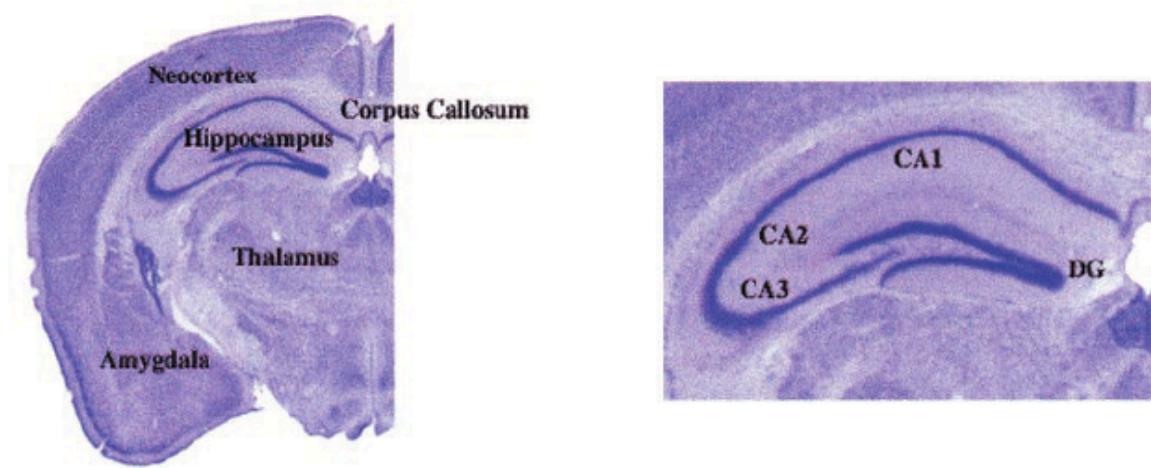


Figura 4. Estructura y organización del hipocampo de ratón. Se muestra a la izquierda un corte coronal de un cerebro de ratón, en el que se identifican las principales estructuras cerebrales. A la derecha, se observa la estructura general del hipocampo, en la cual se indican las regiones CA1, CA2 y CA3 del Asta de Amón y el giro dentado (DG). Adaptado de Skryabin BV, Sukonina V, Jordan U, et al. *Mol Cell Biol*. 2003;23(18):6435-6441.

La EA es un problema de salud que implica costos sanitarios, sociales y económicos afectando tanto al paciente como a su entorno inmediato y al sistema de salud en cuestión. Por lo tanto, representa un enorme desafío para los sistemas de atención médica y genera un gran impacto económico en la sociedad (Alzheimer's Association 2021). Debido a esto, la comunidad científica ha focalizado los esfuerzos en intentar comprender los eventos biológicos que la subyacen, para poder desarrollar tratamientos eficaces.

Al día de hoy, se encuentran aprobados distintos medicamentos para el tratamiento de la EA, entre los que se encuentran donepezilo, rivastigmina y galantamina, inhibidores de la acetilcolinesterasa, que potencian la neurotransmisión colinérgica deteriorada debido a la neurodegeneración. Por otro lado, el antagonista del receptor de NMDA, memantina, es otro medicamento que se prescribe en la actualidad y actúa protegiendo las neuronas del daño producido por excitotoxicidad (Savelieff, Nam et al. 2019). Todos los medicamentos mencionados hasta este punto se basan en tratamientos sintomáticos que no detienen la neurodegeneración, por lo que su efectividad en el retraso de los síntomas se encuentra limitada (Fink, Jutkowitz et al. 2018).

Además, ensayos clínicos demostraron que la eficacia de estos tratamientos es mayor en personas que viven con Alzheimer temprano, que presenten tan solo DCL o demencia leve (Pathak & Kabra 2024).

Recientemente la FDA ha aprobado el uso de los medicamentos aducanumab y lecanemab, los cuales tienen como objetivo cambiar la biología subyacente de la enfermedad. Se trata de dos anticuerpos monoclonales que estimulan la eliminación del A β del cerebro y retardan la progresión de la enfermedad (Vaillancourt 2016; van Dyck, Swanson et al. 2023). Sin embargo, estos medicamentos produjeron una disminución de placas solamente en pacientes en etapas tempranas de la enfermedad, produciendo además, un efecto mínimo a nivel cognitivo (Tampi, Forester et al. 2021). La rápida aprobación de estos medicamentos ha generado controversia ya que no existe una correlación entre la reducción de los depósitos amiloïdes y la mejora de los aspectos cognitivos de los pacientes, lo cual ha llevado a que las placas amiloïdes sean cuestionadas como un blanco terapéutico efectivo para contrarrestar la EA (Heidebrink & Paulson 2024).

Es por los mencionados motivos que se torna imperativa la búsqueda de un tratamiento que logre revertir tanto los síntomas cognitivos como la biología subyacente de la EA, para lo cual es fundamental la disponibilidad de modelos experimentales que reproduzcan fielmente la patología.

Modelos animales

Con el objetivo de comprender de una manera profunda los distintos aspectos que involucran diferentes enfermedades, se desarrollan modelos animales que logren imitar los principales signos de las mismas. En el caso de la EA, un modelo válido debe poder imitar no solo la histopatología, sino también el deterioro cognitivo y la pérdida neuronal, siendo además progresivos con la edad.

Un problema a la hora de estudiar la enfermedad en ratones es el hecho de que las cepas *wild type* no desarrollan placas seniles de A β ni forman agregados de tau, incluso en edades avanzadas. Sin embargo, con el avance de

la ingeniería genética se lograron desarrollar modelos murinos de la EA mediante la introducción de los genes humanos APP o PSEN1 con las variantes correspondientes a la EA familiar (Yokoyama, Kobayashi et al. 2022).

El primer modelo murino en el que se logró desarrollar la patología amiloide fue el PDAPP, el cual expresa el gen humano APP con la mutación *Indiana* (V717F) característica de la EA familiar, logrando de esta manera modelar el deterioro cognitivo (Games, Adams et al. 1995; Chen, Chen et al. 2000). Con el tiempo, los ratones PDAPP fueron modificados para combinar más de una mutación. El modelo PDAPP-J20 sobreexpresa el gen humano APP con la mutación *Indiana* y la doble mutación *Swedish* (KM670/671NL). Estos ratones presentan déficit cognitivo y formación de placas amiloides a partir de los 6 meses de edad, junto con signos claros de reactividad glial. Por otro lado, se ha observado que este modelo presenta hiperfosforilación de tau (Mucke, Masliah et al. 2000; Simon, Schiapparelli et al. 2009). Estudios realizados por nuestro grupo reportaron además, alteraciones tempranas en la memoria espacial, en la neurogénesis y signos de neurodegeneración en este modelo (Beauquis, Pavia et al. 2013; Beauquis, Vinuesa et al. 2014).

Existen otros modelos que involucran a alteraciones en el procesamiento de APP, como los ratones APP/PS1 o el .quíntuple transgénico (5xFAD) que coexpresan mutaciones en APP y mutaciones en el gen PSEN1, que codifica para uno de los componentes del complejo γ -secretasa. (Kamphuis, Mamber et al. 2012; Oakley, Cole et al. 2006). Si bien ambos modelos logran desarrollar una patología amiloide conjunta con una alteración de la memoria, es importante tener en cuenta que raramente se encuentra en un paciente una acumulación de mutaciones simultáneas en más de uno de estos genes. Además, estos modelos se caracterizan por presentar síntomas a edades muy tempranas o muy avanzadas de la enfermedad, sin lograr representar la progresividad característica de la EA.

Por otro lado, el modelo triple transgénico (3xTg-AD) combina las mutaciones humanas APP *Swedish*, una forma mutante de PSEN1 y la proteína tau con una mutación que promueve el agregado de su forma hiperfosforilada

(Oddo, Caccamo et al. 2003). Si bien este modelo es uno de los más utilizados para estudiar el desarrollo de la tauopatía y su relación con la patología amiloide, presenta una lenta cinética de aparición de depósitos amiloideos y un fenotipo conductual controvertido, que incluye miedo y ansiedad exacerbados, y déficit motores, sensoriales y de atención (Sterniczuk, Antle et al. 2010; Simanaviciute, Brown et al. 2022).

Si bien los modelos de roedores transgénicos son los más utilizados a la hora de estudiar la enfermedad, debe tenerse en cuenta algunos aspectos. Por un lado, se sostiene que al no desarrollar la patología a partir de sus genes endógenos (sino que requieren inserciones de genes humanos) se pierde información sobre la fisiología del desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, al tratarse de modelos basados en la expresión de las variantes familiares de la EA, y por lo tanto directamente vinculados a la hipótesis de la cascada amiloide, no puede garantizarse que los mecanismos encargados de desarrollar la patología se correspondan con los desencadenados en la forma esporádica de la enfermedad (Drummond & Wisniewski 2017).

Actualmente, no existen modelos animales que reproduzcan fielmente la EA esporádica de aparición tardía. Esto se debe a que la enfermedad no está causada únicamente por variantes genéticas, sino por una combinación de factores genéticos y ambientales, cuya interacción aún no ha sido completamente dilucidada. Sin embargo, teniendo en cuenta la complejidad de la patogénesis que implica esta enfermedad, los modelos de roedores han sido relevantes para obtener información crucial sobre sus fundamentos neurobiológicos, y sobre todo para evaluar la propuesta de diferentes tratamientos farmacológicos que permitan resolver la necesidad de un tratamiento eficaz a futuro (Chen & Zhang 2022).

Metformina

En la búsqueda de medicamentos que sirvan como tratamiento para enfermedades complejas, se desarrolló la estrategia de reposicionamiento de drogas, la cual tiene como objetivo identificar efectos farmacológicos novedosos en medicamentos convencionales, los cuales presentan una seguridad y

efectividad ya verificada en humanos, para ser empleados como tratamiento en enfermedades diferentes a aquellas para las cuales tienen aprobado su uso original (Ashburn & Thor 2004).

La metformina (MET) es una biguanida oral derivada de la planta medicinal *Galega officinalis*, que se utilizaba para tratar los síntomas de la diabetes en Europa en el siglo XVIII. En 1994, fue autorizada por la FDA de los Estados Unidos para su uso como tratamiento para la diabetes. Posteriormente, en 2011, fue incluida en la lista de medicamentos esenciales de la OMS (Bailey 2017). Actualmente, la MET es el fármaco antidiabético de primera línea para el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 2 (Engler, Leo et al. 2020). Se trata de un agente normoglucemiante para pacientes con hiperglucemia, aumentando la sensibilidad a la insulina y reduciendo la síntesis de glucosa hepática y su absorción intestinal. Se destaca entre otras drogas antidiabéticas debido a que no produce hipoglucemia, lo cual le otorga potencialidad para su uso en pacientes no diabéticos cuya glucemia se encuentra en niveles normales (Frayn, Adnitt et al. 1971).

En el marco de la estrategia de reposicionamiento de drogas, debido a sus mecanismos de acción pleiotrópicos, se ha propuesto estudiar el potencial terapéutico de MET para tratar enfermedades diferentes a la diabetes tipo 2 (DM2), como el cáncer y distintos tipos de demencia (Chow, Yang et al. 2022; Foretz, Guigas et al. 2023). Se ha observado que el uso de MET se asocia a una ralentización del deterioro cognitivo y una reducción de la demencia en adultos mayores, sin embargo, estos estudios observacionales se limitan a pacientes que utilizan MET por padecer DM2 (Samaras, Makkar et al. 2020). Por otro lado, un estudio observacional llevado a cabo por nuestro grupo encontró efectos beneficiosos en pacientes de DM2 que utilizaron MET durante las primeras etapas de la EA (Pomilio, Perez et al. 2022).

Si bien al día de hoy se desconocen los mecanismos moleculares exactos por los que ejerce sus efectos antidiabéticos y su potencial terapéutico en el cerebro, se sabe que MET inhibe de manera específica, leve y reversible al complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lo que resulta

en una caída moderada en el nivel energético de la célula (Detaille, Guigas et al. 2002, Stephenne, Foretz et al. 2011). Esta disminución en el nivel de energía se correlaciona directamente con una síntesis disminuida de ATP, y un aumento de los niveles de AMP, los cuales son detectados por la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), activándola (Carling 2017). AMPK es un sensor del estado energético celular, que en este caso se activa al menos indirectamente por metformina, aunque algunos autores sugieren que también podría actuar directamente sobre esta enzima (Zhou, Myers et al. 2001; Wang, An et al. 2019). La AMPK está involucrada en la regulación del metabolismo energético favoreciendo las vías catabólicas, aumentando la síntesis mitocondrial, disminuyendo el estrés oxidativo, facilitando el reciclado de estructuras celulares por autofagia y modulando negativamente la inflamación (figura 5) (Rotermund, Machetanz et al. 2018).

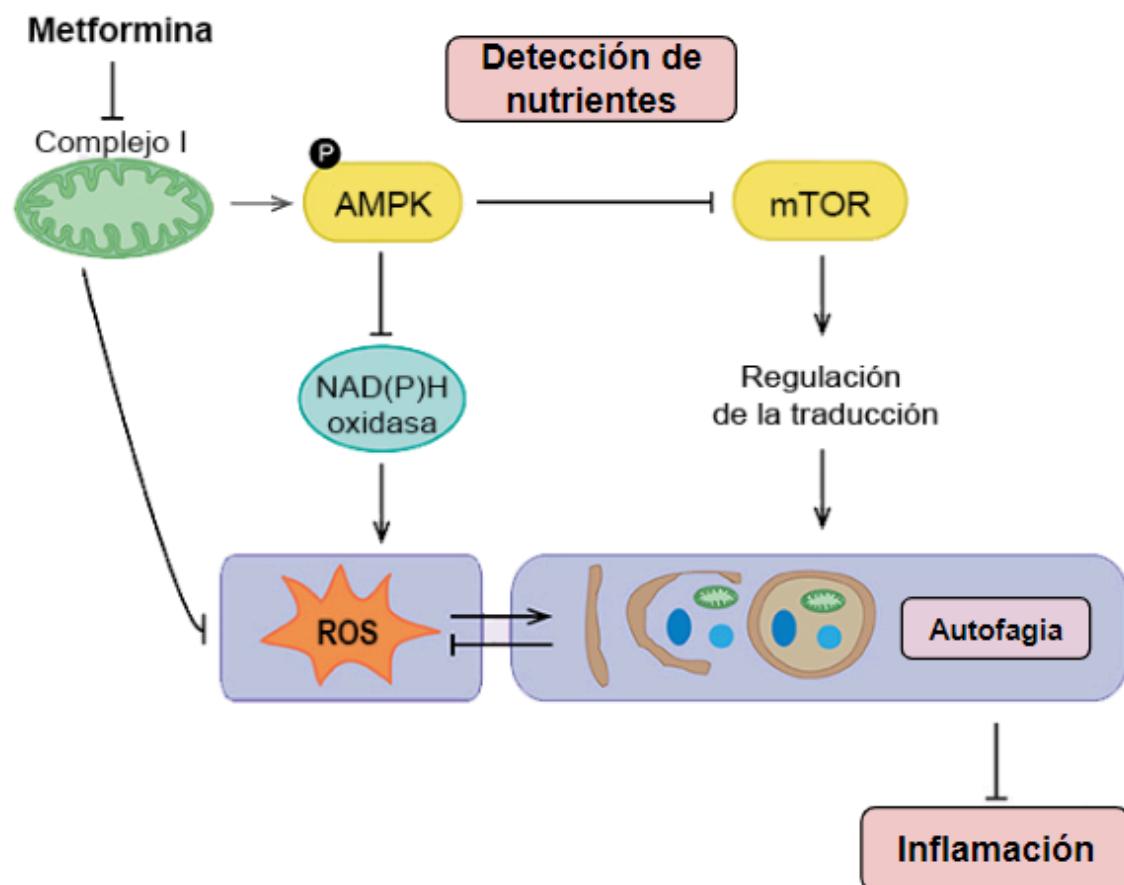


Figura 5. Mecanismo de acción general de metformina y procesos celulares regulados por esta. Adaptado de Rotermund, Machetanz et al. 2018 (Rotermund, Machetanz et al. 2018).

Diversos estudios mostraron los beneficios de la activación de AMPK inducida por MET en modelos experimentales de enfermedades con marcada neuroinflamación. Ou y colaboradores, utilizando ratones de 6 meses de edad de la cepa APP/PS1, y realizando inyecciones intraperitoneales de MET durante 14 días, mostraron que MET es capaz de atenuar el déficit de la memoria espacial, la neurodegeneración hipocampal y de promover la neurogénesis, además de disminuir la carga de placas de A β y el tono neuroinflamatorio (Ou, Kong et al. 2018). Por otro lado, utilizando ratones de 9 meses de edad de la misma cepa, y administrando durante dos meses MET en el agua de bebida, Chen *et al.* mostraron su capacidad de revertir la patología tau y la carga de placas amiloides, además de mejorar la autofagia microglial, que se encuentra afectada en este modelo (Chen, Zhao et al. 2021).

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios que demuestran sus efectos beneficiosos, existen evidencias contradictorias en las que el uso de MET induce procesos deletéreos, por ejemplo aumentando los niveles o actividad de β -secretasa y de APP e impidiendo el transporte de A β a través de la BHE, promoviendo la producción y el agregado de A β (Chen, Dong et al. 2016; Picone, Vilasi et al. 2016). Por otro lado, se observó que MET induce la disfunción mitocondrial y la muerte neuronal cuando es administrado de manera crónica en ratones de la cepa C57B6/J (Picone, Vilasi et al. 2016). En ratas que modelizan la EA, se observó un aumento en la gliosis reactiva debido al uso de MET, lo que resulta en una inducción del cuadro neuroinflamatorio característico de la enfermedad (Pilipenko, Narbute et al. 2020). Además, diversos estudios *in vitro* realizados sobre células neuronales que modelan la patología amiloide, mostraron que el uso de MET induce la producción y el agregado de A β , sin producir efectos sobre su degradación (Chen, Zhou et al. 2009).

Por lo tanto, aún falta evidencia que revele el mecanismo de acción concreto por el cual MET produce tanto los efectos terapéuticos como aquellos no deseados (Kajbaf, De Broe et al. 2016). Como se mencionó anteriormente, Ou y colaboradores demostraron que junto con los efectos positivos de MET en ratones APP/PS1 se observó una activación de la vía de AMPK específicamente en astrocitos y microglía, células que participan del sostén de la función neuronal y la

respuesta inflamatoria (Ou, Kong et al. 2018). Estos resultados sugieren que el efecto de MET podría variar dependiendo del tipo celular, lo que nos invita a explorar cómo se ve afectado cada tipo celular por el fármaco, tanto en términos de sensibilidad como de respuesta.

Microglía

Las células microgliales constituyen alrededor del 10% de todas las células del cerebro adulto y son consideradas las células inmunes residentes del sistema nervioso central (SNC). Estas células cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y la respuesta inmune del SNC, además de monitorear cambios en la actividad neuronal, y participar en la modulación de funciones cognitivas superiores como el aprendizaje y la memoria (Parkhurst, Yang et al. 2013; Gomez-Nicola & Perry 2015).

La microglía es capaz de detectar patrones moleculares asociados a daño y a patógenos y generar una respuesta de reparación en el tejido (Wolf, Boddeke et al. 2017). Por otro lado, participa tanto en el establecimiento de la conectividad neuronal normal, como en procesos reguladores críticos del SNC, mediante un mecanismo denominado poda sináptica, en el cuál se eliminan sinapsis defectuosas, promoviendo así la correcta actividad neuronal (Paolicelli, Bolasco et al. 2011).

Históricamente, las células microgliales fueron consideradas como los macrófagos residentes del sistema nervioso debido a su supuesto origen común durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, al día de hoy su origen sigue siendo controversial, sosteniéndose la idea de que provienen del saco vitelino formando un linaje independiente al de los macrófagos tisulares (Ginhoux, Greter et al. 2010). Ambos tipos celulares comparten un perfil proteico similar, siendo positivos para marcadores clásicamente empleados como Iba1 (*Ionized calcium-binding adapter molecule 1*). Sin embargo, en los últimos años se ha empezado a utilizar marcadores específicos de microglía, como Tmem19 (*Transmembrane protein 19*) que permiten evaluar los cambios que ocurren a

nivel microglial, independientemente de macrófagos que eventualmente puedan atravesar la barrera hematoencefálica en un contexto de daño (Satoh, Kino et al. 2016).

La microglía exhibe diversos fenotipos en respuesta a las señales de su entorno, por lo que su estado de activación puede evidenciarse por su morfología. Cuando se encuentran en un estado quiescente, las células presentan procesos largos y ramificados, los cuales se encargan de monitorear continuamente los cambios en el microambiente del parénquima cerebral, mientras que una microglía activada presenta una morfología del tipo ameboide, mostrando procesos retraídos y somas agrandados (Nimmerjahn, Kirchhoff et al. 2005). Frente a un estímulo, la microglía puede responder dentro de un gran espectro de activación en el que se describen, dentro de un continuo de diferentes fenotipos intermedios, dos estados de polarización opuestos. El estado microglial clásico (M1) es normalmente inducido por interferón-γ y lipopolisacárido bacteriano (LPS), y se caracteriza por provocar una respuesta proinflamatoria mediante la liberación al medio de citoquinas y quimiocinas como IL-1β, IL-6 y TNF-α, además de especies reactivas del oxígeno, por lo que esta respuesta puede provocar daño neurológico si no es correctamente regulada. Por el contrario, el estado de polarización alternativo (M2) produce una respuesta mediada por la liberación de citoquinas antiinflamatorias, como IL-10, TGF-β y factores de crecimiento y de supervivencia, por lo que se induce un proceso antiinflamatorio y neuroprotector (Colonna & Butovsky 2017; Guo, Wang et al. 2022).

La inflamación es un proceso regulado por diversos mecanismos celulares. Cuando los receptores especializados en reconocer patrones moleculares asociados a daño o a patógenos, se transloca al núcleo el factor nuclear *kappa*-B (NF-κB), un factor de transcripción que modula la expresión de genes relacionados con la respuesta proinflamatoria (Mitchell & Carmody 2018). Por otro lado, las señales de daño intracelular pueden llevar al ensamblado de inflamasomas, los cuales son complejos proteicos que reclutan proteínas involucradas en el procesamiento y maduración de citoquinas proinflamatorias (Broz & Dixit 2016).

En un contexto patológico en el que la producción y acumulación de residuos es mayor que la capacidad de las células microgliales de eliminarlos, se produce una activación persistente de la microglía (Block & Hong 2007; Al-Ghraiyyah, Wang et al. 2022). Esta activación persistente sostiene los niveles de producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y de agentes citotóxicos, lo que provoca efectos perjudiciales en las funciones cerebrales, generando un cuadro neuroinflamatorio característico de las enfermedades neurodegenerativas (Streit, Mrak et al. 2004).

Diversos autores propusieron la utilización de fármacos antiinflamatorios para tratar la enfermedad (Ozben & Ozben 2019). En la actualidad, tras numerosos estudios basados en el uso de antiinflamatorios no esteroideos para tratar la EA, no existen recomendaciones para su uso en la prevención o el tratamiento de la demencia o el deterioro cognitivo. Por ello, diversos grupos propusieron focalizar sus esfuerzos en encontrar tratamientos sobre la biología subyacente de la EA, que indirectamente sean capaces de modular la neuroinflamación. Conociendo que la translocación de NFkB puede ser inhibida por la activación de AMPK, se propuso que la inducción de esta vía puede resultar en una mejora del cuadro neuroinflamatorio (Tao, Li et al. 2018). En este sentido, surgieron estudios sobre el potencial de MET como tratamiento para la neuroinflamación (J.-S. Ha et al. 2019; Mudgal, Nampoothiri et al. 2019; Bai & Chen 2021). Estudios realizados en ratones diabéticos mostraron que MET reprime la activación de la señalización de NFkB, disminuye la gliosis reactiva y aumenta la supervivencia neuronal (Oliveira, Nunes et al. 2016). En tejidos hipocampales de rata que modelizan la EA, se observó que MET aumenta la neurogénesis y disminuye significativamente los niveles de citoquinas proinflamatorias (Saffari, Alijanpour et al. 2020). Por otro lado, estudios realizados en células de la línea microglial murina BV2 que mostraban un fenotipo proinflamatorio al ser expuestas a LPS, se observó una disminución de la expresión de IL-1 β y de la generación de ROS frente al tratamiento con MET (Tayara, Espinosa-Oliva et al. 2018).

Los antecedentes revisados en esta sección nos llevan a pensar en el rol de MET como un posible tratamiento frente a la inflamación crónica que caracteriza a la EA. Por otro lado, la inducción de AMPK por parte de MET nos obliga a enfocar la mirada en su interacción con otras vías de señalización, siendo la autofagia uno de los principales procesos que se encuentran modulados por la misma.

Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado de degradación lisosomal, mediante el cuál las células eucariotas reciclan componentes subcelulares disfuncionales o dañados como macromoléculas, agregados de proteínas mal plegadas y organelas deterioradas, para el mantenimiento de la función celular normal y la homeostasis intracelular (Zhang, Chang et al. 2015; Lahiri, Hawkins et al. 2019). Además, la autofagia es el principal mecanismo de control de calidad y reciclado de mitocondrias disfuncionales, las cuales al acumularse implican focos de producción de ROS, impidiendo los potenciales daños causados por las mismas, lo cual resulta clave en células sometidas a senescencia (Kerr, Adriaanse et al. 2017).

La autofagia se clasifica en tres categorías principales según cómo es transportado el material citoplasmático a la luz lisosomal: microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas (Lamming & Bar-Peled 2019). Entre ellas, la macroautofagia (en lo sucesivo denominada autofagia) es la vía más estudiada y mejor caracterizada en células eucariotas. La autofagia comienza con la fosforilación del complejo ULK1 (*Unk Like Kinase 1*), la cual forma un complejo de iniciación al interactuar con distintas proteínas asociadas a la autofagia (proteínas ATG), promoviendo, a partir de una membrana de aislamiento que se escinde desde alguna organela, la formación de una estructura lineal de doble bicapa lipídica denominada fagoforo. Luego de su formación, el fagoforo elonga su doble membrana hasta cerrarse sobre sí mismo, acumulando en su interior parte del contenido citoplasmático. A esta estructura cerrada se la denomina autofagosoma. Durante la formación del autofagosoma, la proteína LC3

pasa de su forma citosólica delipidada (LC3-I) a su forma lipidada (LC3-II), incorporándose a la membrana del autofagosoma en formación. Por otro lado, la proteína p62 (ubiquitin-binding protein 62), que interactúa con cadenas de poliubiquitina, se une a LC3-II. Esto hace que la incorporación de parte del citoplasma que ocurre durante la formación del autofagosoma se vuelva semi-específica al introducir proteínas que están marcadas para su degradación. Por último, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con un lisosoma formando un autolisosoma, el cual degrada la membrana interna del autofagosoma junto con las sustancias contenidas en su interior (Figura 6) (Zhou, Tan et al. 2013; Klionsky, Abdelmohsen et al. 2016).

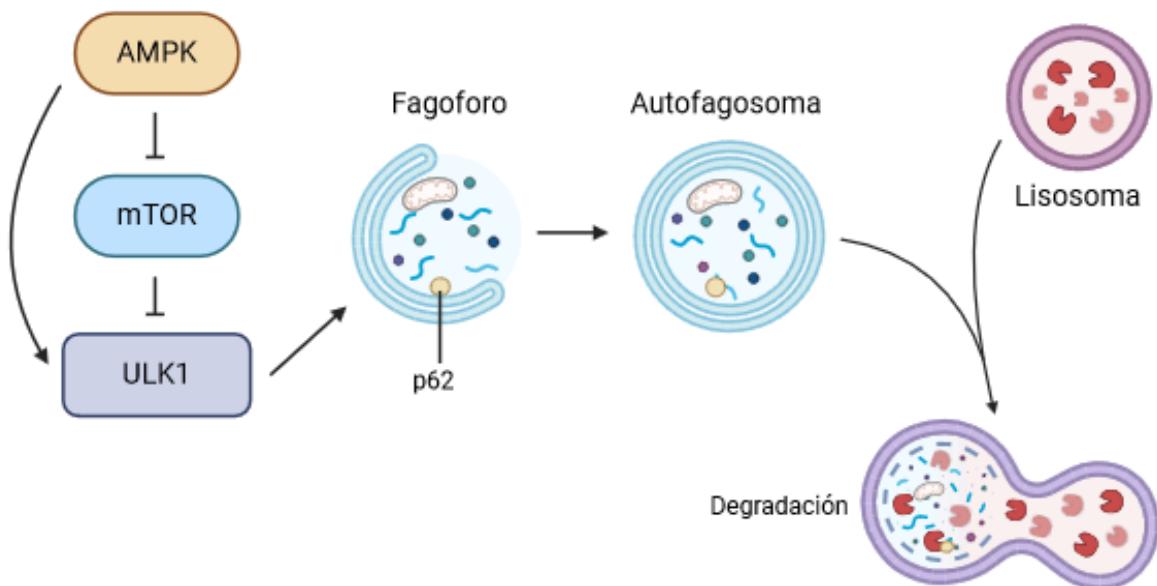


Figura 6. Mecanismo de autofagia. Representación esquemática del flujo autófágico y su regulación. Figura creada con *BioRender.com*.

Es importante destacar que, al degradarse el contenido del autolisosoma, también se degradan LC3-II y p62. Es por este motivo que los niveles de p62 se utilizan para evidenciar la actividad autófágica. Sin embargo, como se trata de un proceso dinámico, la autófagia no puede evaluarse estáticamente, por lo que en cultivos celulares deben utilizarse controles que la bloquen, como por ejemplo, Bafilomicina A1, un inhibidor de ATPasas vacuolares que impide la acidificación de los lisosomas (Klionsky, Abdelmohsen et al. 2016).

Si bien, en condiciones fisiológicas existe un flujo autofágico basal, la autofagia se induce principalmente por escasez de nutrientes o de energía, los cuales desencadenan una cascada de eventos de señalización y reclutamiento que pueden implicar la activación de AMPK y la inhibición de mTORC1 (por sus siglas en inglés de “mammalian target of rapamycin”), el principal supresor de la autofagia (Chang, Juhasz et al. 2009). mTOR funciona como un sensor de la disponibilidad de nutrientes del medio celular mediante la detección de los niveles de aminoácidos presentes en el medio. Cuando la disponibilidad de nutrientes es elevada, mTOR bloquea la autofagia mediante la inhibición de ULK1 (Kim, Jung et al. 2015; Park, Jung et al. 2016; Schmitz, Cox et al. 2021).

En un contexto patológico en el cual la eliminación de agregados citotóxicos juega un rol fundamental para preservar la salud neuronal y evitar la neuroinflamación, la autofagia adquiere un papel imprescindible (Caponio, Veverova et al. 2022). En la EA la autofagia no solo se encuentra comprometida, sino que su alteración contribuye a la progresión de la enfermedad (Nixon & Yang 2011; Zeng, Siu et al. 2019). Particularmente, existe evidencia acerca de la activación exacerbada de mTOR en tejido cerebral de pacientes con EA, lo que evidencia una inhibición de la autofagia (Sun, Ji et al. 2014). Además, otros trabajos que describen el rol de la autofagia en la EA mostraron que la inducción generalizada de la autofagia facilita la degradación de agregados de A β y Tau, y que su inhibición aumenta significativamente la presencia de los depósitos tóxicos (Pickford, Masliah et al. 2008; Wang, Martinez-Vicente et al. 2009).

En células gliales, la autofagia tiene una gran relevancia para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central, destacándose entre otras cosas, su capacidad para internalizar y degradar por autofagia los acumulados extracelulares de A β , proceso que se ve afectado en la EA (Plaza-Zabala, Sierra-Torre et al. 2017). Estudios realizados por nuestro grupo mostraron la existencia de un bloqueo en la autofagia microglial, en modelos tanto *in vivo* como *in vitro* de la EA. Cuando células microgliales de la línea BV2 fueron expuestas a A β , mostraron una afectación del flujo autofágico y daño lisosomal, que fue dependiente del tiempo de exposición. En ratones PDAPP-J20 se observó una acumulación de p62 y agregados de ubiquitina en células microgliales cerca de

los depósitos amiloides del hipocampo, además de verse cambios morfológicos de la microglía que aparecen previos a la formación de las placas, pero que se acentúan con la acumulación de A β durante el avance de la enfermedad. Esto fue validado mediante la observación de vesículas autofágicas en células microgliales que rodean a placas amiloides en cortes de pacientes *post mortem* (Pomilio, Gorjod et al. 2020).

Por otro lado, la presencia de agregados citotóxicos favorece la instalación de un cuadro de neuroinflamación crónico que impacta sobre la autofagia. En particular, el inflamasoma NLRP3 (*Nod like receptor protein 3*) es capaz de reconocer proteínas mal plegadas e inducir la maduración de citoquinas proinflamatorias (Schroder & Tschopp 2010). Diversos estudios, tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado que la inducción de la autofagia inhibe la activación del inflamasoma y reduce la secreción de citoquinas inflamatorias, rescatando la muerte neuronal generada por el contexto inflamatorio (Bussi, Peralta Ramos et al. 2017; Takahama, Akira et al. 2018; Gui, Liu et al. 2024). Estos resultados nos llevan a pensar que la restauración del flujo autofágico en las células microgliales podría indirectamente revertir además el cuadro de inflamación crónica que caracteriza a la EA.

En línea con lo mencionado en el párrafo anterior, conociendo que el tono inflamatorio disminuye al inducir la vía de AMPK, al inhibir a NFkB, y sabiendo que la activación de AMPK promueve la autofagia al inhibir mTOR, nos propusimos estudiar el uso de MET como tratamiento contra la EA.

Objetivos e Hipótesis

Objetivos e Hipótesis

Se propone como **objetivo general** de esta Tesis de Licenciatura evaluar la capacidad de la droga antidiabética metformina para revertir algunas de las alteraciones características de la enfermedad de Alzheimer en modelos experimentales, focalizando en los cambios que experimentan las células microgliales. Se propone como **hipótesis** que *metformina tiene la capacidad de mejorar el estado cognitivo de ratones que modelizan la patología, en asociación con un menor estado de reactividad de la microglía, y que este efecto se logaría a través de la restauración del flujo autofágico y de la preservación del funcionamiento mitocondrial*. Para el cumplimiento de este objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1. Evaluar el impacto de metformina sobre el deterioro cognitivo, la patología amiloide y el grado de activación y autofagia microglial en ratones PDAPP-J20, modelo murino de la EA. Se propone como hipótesis que el tratamiento con metformina está asociado a una mejora cognitiva, a una disminución de la patología amiloide, a un menor grado de activación microglial, evaluada mediante su morfología y marcadores de microglía homeostática; y a un restablecimiento del flujo autofágico.

Objetivo específico 2. Realizar una puesta a punto de las condiciones experimentales *in vitro* que modelizan aspectos de la EA sin afectar la viabilidad celular, y evaluar los efectos directos de metformina sobre las células microgliales expuestas a A β , paralelizando la EA. Se propone como hipótesis que la exposición a péptidos β -amiloide genera daño mitocondrial y bloqueo del flujo autofágico, y que esto se revierte por el tratamiento con metformina.

En términos prácticos, también son objetivos de esta tesis de licenciatura familiarizarse con la proposición de hipótesis en investigaciones biomédicas básicas y el uso de diferentes modelos experimentales para poner a prueba estas hipótesis, adquirir experiencia práctica en el manejo de cultivos celulares y los detalles de su manipulación, así como también adquirir herramientas para la evaluación comportamental de ratones de laboratorio.

Materiales y Métodos

Materiales y métodos

Experimentos in vivo

Animales

1. Ratones PDAPP-J20

Para realizar esta tesis de licenciatura se empleó la cepa de ratones PDAPP-J20. Nuestro grupo dispone de una colonia propia en el bioriego del Instituto de Biología y Medicina Experimental (CONICET) gracias al aporte de la doctora Verónica Galván, del *Buck Institute* (California, Estados Unidos). Se emplearon animales de 9 meses de edad, los cuales ya presentan marcados signos de la enfermedad, correspondiendo por lo tanto a una etapa sintomática. Estos ratones portan en hemigigosis el transgen para la expresión de la APP humana con las mutaciones *Swedish* (K670N/M671L) e *Indiana* (V717F) bajo el control del promotor de la cadena β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF β) de expresión neuronal, y muestran claros depósitos amiloideos en el hipocampo desde los 6 meses de edad. La cepa es mantenida mediante cruzamiento con ratones C57BL/6. En todos los experimentos en que se emplearon ratones transgénicos (Tg), se utilizaron sus hermanos no transgénicos (NTg) como control. Los ratones se mantuvieron en racks ventilados bajo condiciones controladas de temperatura (22°C) y humedad (50%) con ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h. Para la identificación del genotipo de cada animal, en el momento del destete se extrajo ADN a partir de una pequeña muestra de tejido de la cola y se realizó una PCR usando primers específicos para el transgen humano.

2. Tratamientos

No fue parte de la presente tesis de licenciatura el manejo de los animales por parte del autor. La manipulación, la administración de los tratamientos, los experimentos y los sacrificios fueron realizados por integrantes de nuestro grupo especializados en el manejo de estos ratones, y bajo la aprobación ética del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

2.1. Administración de metformina

Se realizaron inyecciones intraperitoneales de 220 μ L vehículo (PBS) o MET al 4%, lo que equivale a una dosis de 240 mg/kg, durante tres días a la semana, por tres semanas. Es importante destacar que esta dosis, aunque superior a la que se administra a pacientes diabéticos, es considerablemente menor que las dosis utilizadas en otros estudios experimentales en ratones que reciben metformina por vía intraperitoneal. Se empleó como vehículo el mismo buffer PBS que se utilizó para disolver la droga. Se destinaron originalmente 10 ratones por grupo, aunque el número de ratones Tg puede ser menor debido a su mayor mortalidad al llegar a edades adultas.

2.2. Eutanasia y generación de cortes histológicos

Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg BW; Holliday-Scott, Argentina) y xilacina (10 mg/kg BW; Bayer, Argentina). Luego de comprobar la ausencia de reflejos fueron sacrificados mediante decapitación. Los cerebros fueron removidos del cráneo, seccionados ambos hemisferios y fijados a 4°C durante una noche. Luego el tejido fue cortado coronalmente con vibratomo en secciones de 60 μ m de espesor (Vibratome 1000P). Los cortes resultantes se guardaron a -20°C en una placa de 48 pocillos embebidos en solución crioprotectora (25% glicerol, 25% etilenglicol, 50% buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4) hasta su uso, de forma tal que en cada pocillo hubiere 6 cortes equidistantes a lo largo del eje dorsal-ventral, representativos de la totalidad del hipocampo.

Evaluación comportamental

La manipulación de los animales durante las pruebas comportamentales fue realizada por otros miembros del grupo, mientras que el análisis del material generado sí forma parte del desarrollo de esta Tesis.

Se realizó una prueba de *Novel Object Recognition* (NOL) en grupos de ratones NTg tratados con vehículo y Tg tratados con vehículo MET. Los ratones fueron evaluados en una caja plástica negra (30 x 30 x 30 cm³) a la cual fueron adecuadamente habituados los 6 días previos a la realización de la prueba, omitiendo la inclusión de los objetos. El test consistió en dos ensayos de 10 minutos (sesión de entrenamiento y sesión de evaluación) separados por un intervalo de 1 hora. En la sesión de entrenamiento, los ratones fueron expuestos a dos objetos de plástico idénticos ubicados en dos esquinas contiguas, mientras que durante la sesión de evaluación, uno de los objetos fue movido a una locación novedosa en la esquina opuesta respecto del objeto no desplazado. Los animales fueron grabados durante ambas sesiones para el posterior análisis de los videos.

La cuantificación fue efectuada midiendo los tiempos de exploración, considerando los momentos en los que los animales acercaron sus hocicos a menos de 1 cm de distancia de los objetos. En la sesión de entrenamiento se cuantificó la exploración en orden de determinar una ausencia de preferencias sobre los mismos, verificando que exploren con la probabilidad del azar ambos objetos. El tiempo de exploración fue evaluado como el porcentaje de tiempo que exploraron el objeto relocalizado respecto del tiempo total que mantuvieron una exploración activa sobre cualquiera de los objetos. Establecimos un tiempo mínimo de exploración total de 20 segundos para que el test sea válido.

Tinción con rojo Congo

Se incubaron secciones coronales de cerebro conteniendo hipocampo en el modo de cortes flotantes con una solución de rojo Congo 0,2%, cloruro de sodio 3% e hidróxido de sodio 0,01% en etanol 80% (Biopack) durante 5 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados consecutivos con PBS a temperatura ambiente. Los cortes fueron finalmente colocados en portaobjetos pretratados con gelatina, dejados a secar durante una noche, deshidratados en etanol, aclarados en xileno y finalmente montados con bálsamo de Canadá.

Las imágenes de los cortes fueron tomadas a 40x utilizando un microscopio óptico Nikon Eclipse E200 y posteriormente analizadas empleando el software ImageJ (NIH). Se midió la carga de placas amiloides como el área total positiva para la tinción luego de definir un umbral para la marca positiva de rojo Congo en el hipocampo, relativo al área total del hipocampo. Por otro lado, se midieron el número y tamaño de cada una de las marcas positivas para la tinción en el hipocampo. Todos los parámetros fueron promediados entre los distintos cortes de un mismo animal.

Inmunohistoquímica

1. Protocolo

La inmunotinción del tejido fue realizada según el método de cortes flotantes, evaluando seis diferentes secciones cerebrales por ratón, considerando tanto la parte dorsal como ventral del hipocampo. Se realizaron lavados exhaustivos con PBS para eliminar los restos de solución crioprotectora. Posteriormente se realizó un paso de recuperación del antígeno utilizando Buffer citrato 0.01 M, pH 6, a 85°C en baño termostático durante 30 minutos. Luego de realizar lavados con PBS para eliminar el citrato de las muestras, se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos con suero de cabra 10% disuelto en PBS-Tritón 0,1% (solución de bloqueo) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron *overnight* (ON) a 4°C con los anticuerpos primarios anti-Tmem19 (ab209064, hecho en conejo) a una concentración de 1/750 y anti-p62 (SC-28359, hecho en ratón) en una concentración 1/500. Luego de sus correspondientes lavados, los cortes fueron incubados *overnight* a 4°C con los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo acoplado al fluoróforo Alexa 488 (verde, *Invitrogen*) en una concentración de 1/1000 y anti-IgG de ratón acoplado al fluoróforo Alexa 555 (rojo, *Invitrogen*) en solución de bloqueo. Finalmente, los cortes fueron lavados y colocados en portaobjetos pretratados con gelatina y montados con alcohol polivinílico con DABCO (Sigma).

2. Análisis de imágenes

Los cortes se observaron en un microscopio confocal (Olympus DSU IX-83), y se tomaron imágenes a 40X. Las mismas fueron tomadas con microscopía confocal sobre el hilio del giro dentado, tomando regularmente planos discretos a lo largo del espesor del corte (Z-stack). Se utilizaron al menos 4 cortes representativos de todo el hipocampo por cada ratón, considerando 5 ratones por grupo experimental. El procesamiento de estas imágenes se realizó con el software ImageJ (NIH). Para evaluar la reactividad para el marcador microglial Tmem19, las imágenes generadas en el Z-stack fueron condensadas en una sola imagen (Z-project) que permitió evaluar la disposición de la microglía de manera representativa en todo el corte histológico. Para la evaluación de la acumulación de autofagosomas en la microglía mediante la colocalización de Tmem y p62, se utilizó un único plano representativo del Z-stack. La colocalización de ambas señales se realizó estimando el coeficiente de Manders M1 (porcentaje de la señal positiva para Tmem que colocaliza con p62) empleando el plugin JACoP del ImageJ.

Experimentos in vitro

Células BV2

1. Mantenimiento de la línea celular

La línea celular BV2 proviene de cultivos primarios de células microgliales inmortalizadas mediante la infección con el retrovirus J2 que lleva el oncogen v-raf/v-myc. Las células se cultivaron en un medio de mantenimiento (RPMI 1640 (Gibco) con antibiótico, suplementado con 10% SFB (Natocor, Argentina), y se incubaron en una estufa de cultivo a 37°C y CO₂ 5%. El medio fue cambiado regularmente cada 2 o 3 días, realizándose los pasajes cuando el cultivo exhibía una confluencia de 80% mediante un breve tratamiento con tripsina 0,25 % (5 minutos a 37°C), seguido de inactivación con medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB).

2. Tratamiento con Aβ

Para el tratamiento de las células se utilizó Aβ₄₂, el cual fue almacenado en una concentración de 0,5 mM en DMSO. La fibrilización consistió en incubar los péptidos a una concentración final de 50 μM en agua estéril durante 72 hs a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para evitar la formación de agregados de muy alto peso molecular, se realizó un paso de sonicación. Para ello se utilizó un sonicador de baño (Bioruptor Plus, Diagenode cat.B01020001) en modo *LOW*, siguiendo un protocolo de 5 ciclos de 15 segundos, interrumpidos por 30 segundos sin sonicar. Una vez fibrilizado y sonicado, se diluyó en medio de mantenimiento hasta la correspondiente concentración final, y luego se expuso a las células durante 24 horas para su tratamiento.

3. Tratamiento con MET

El tratamiento con MET (Sigma, EE.UU.) fue realizado a las concentraciones 0,2 mM y 2 mM disueltas en medio de mantenimiento durante 1 o 24 horas. En los experimentos que incluyen un tratamiento con Aβ, se realizó una dilución de un *stock* de MET 4% hasta la concentración final de 2 mM, en medio conteniendo Aβ o vehículo.

Ensayos de viabilidad

1. Ensayo de viabilidad por MTT

El ensayo de MTT se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT; SCBT, EE.UU.), realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, dando como producto un compuesto coloreado de color azul, el formazán. Para la realización del experimento, se sembraron las células BV2 en placas de 96 pocillos con RPMI + 10% de SFB, y se las dejó crecer por 24 hs en estufa a 37°C. Luego se colocaron los tratamientos con A_β o MET en las diferentes condiciones experimentales. Al cabo del tiempo correspondiente, se descartó el medio de cultivo y se incubó con MTT y RPMI con 10% SFB a 37°C por una hora. Se descartó el sobrenadante y el producto obtenido se resuspendió en dimetilsulfóxido (DMSO) y finalmente se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro.

2. Ensayo de viabilidad con ioduro de propidio

Durante los últimos 15 minutos de la exposición de las células a sus respectivos tratamientos con A_β y/o MET, las células se incubaron con los colorantes fluorescentes DAPI, en una concentración de 1/10000, y Ioduro de propidio, en una concentración de 1/500 en el medio de cultivo. Las células fueron observadas y fotografiadas en distintos campos mediante microscopía de epifluorescencia. Las imágenes fueron analizadas utilizando ImageJ, cuantificándose el porcentaje de células que mostraron una colocalización entre ambos marcadores.

Evaluación de ROS mitocondriales

Para la medición de ROS mitocondriales se utilizó el indicador MitoSox Red (*Molecular Probes, Invitrogen, M36008*), el cual consiste en un colorante fluorogénico dirigido específicamente a las mitocondrias, que tras ser oxidado por superóxido mitocondrial, produce una fluorescencia roja brillante. Las células BV2 fueron sembradas en placas de 24 pocillos y posteriormente tratadas con A_β₄₂ y/o

con MET. Tras su debido tratamiento y su posterior lavado con PBS, las células fueron expuestas a MitoSox 5 μ M durante 15 minutos a 37°C. Luego fueron lavadas y fijadas con PFA 4% por 15 minutos y posteriormente tratadas con DAPI en una concentración 1/10000, por 1 minuto. Finalmente, tras sus respectivos lavados, las células fueron montadas con PVA con DABCO.

Las células fueron observadas utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus DSU IX-83) y las fotos obtenidas colocando el foco en el plano de mayor diámetro de los núcleos marcados con DAPI. Los niveles de ROS mitocondriales fueron estimados mediante la densidad óptica de MitoSox, utilizando el software ImageJ (NIH). Se consideraron al menos 30 células por grupo experimental.

Evaluación del flujo autofágico

Para evaluar el flujo autofágico mediante inmunofluorescencia, se sembraron células BV2 en una placa multiwell de 24 pocillos en la cual previamente se colocó un cubreobjetos circular en cada pocillo de manera que las células se adhieran al mismo. Las células fueron incubadas con 0,05 mM de A β (o el correspondiente vehículo con PBS) durante 24 horas y con 0,2 mM de MET (o PBS) durante la última hora de A β , condiciones que fueron definidas en la puesta a punto realizada previamente.

Debido a que p62 se recluta al autofagosoma durante su formación, y se degrada exclusivamente por autofagia, para los experimentos *in vitro* se incluyeron controles que recibieron en simultáneo un tratamiento con Bafilomicina-A1 (Fermentek, Israel) a una concentración de 100 nM durante los últimos 30 minutos del protocolo experimental. Debido a que esta droga es un inhibidor de la actividad lisosomal, permite bloquear la autofagia en su último paso y por lo tanto, un aumento significativo de p62 se interpreta directamente como un bloqueo en el flujo autofágico.

Al finalizar el protocolo de estimulación, se fijaron las células con PFA 4% por 15 minutos. Las células adheridas a los cubreobjetos se lavaron con PBS para

remover el medio. Se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos con BSA 1% (MP Biomedicals, EE.UU.) en PBS Tween 0.05% durante 30 minutos a RT. Se realizó la incubación ON a 4°C en solución de bloqueo, con el anticuerpo primario anti-p62 hecho en ratón (Santa Cruz, SC-B7) a una concentración de 1/200. Tras los correspondientes lavados con PBS, se realizó la incubación por 1 hora a RT, con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado al fluoróforo Alexa 488 a una concentración de 1/700 en solución de bloqueo. Tras los correspondientes lavados, las células fueron tratadas durante 1 minuto con DAPI a una concentración de 1/10000. Tras lavar el DAPI, las células fueron montadas en cubreobjetos tratados con DABCO.

Se obtuvieron imágenes empleando un objetivo de 60x empleando un microscopio confocal (Olympus DSU IX-83). Se seleccionaron al azar al menos 30 células, representativas de 10 campos diferentes, sobre las cuales se midió el porcentaje del área celular ocupada por autofagosomas p62+ empleando un umbral definido por el usuario con el software ImageJ.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en la presente Tesis de Licenciatura se realizó empleando el software *GraphPad Prism 9*. Se realizaron *Test de t* para una o dos muestras, comparando en algunos casos contra una media teórica, y ANOVA de una o dos vías seguidos por comparaciones de Tukey o de Dunnett según corresponda en cada experimento. Para cada determinación, el análisis específico que se haya realizado se indica en el respectivo pie de figura. Todo análisis fue realizado de manera ciega a los grupos experimentales. Los datos se expresaron en los gráficos de barra como la media \pm el error estándar. En cada figura se muestra el N en forma de puntos. El N de cada experimento se determinó a partir de pruebas pilotos realizadas previamente por integrantes de nuestro grupo, estimándose una potencia del 80%. En todos los casos se consideraron diferencias significativas a aquellas que se corresponden con un p-valor menor que 0,05.

Resultados

Resultados

El tratamiento con metformina generó una mejora a nivel cognitivo y una tendencia a la reducción de la patología amiloide en un modelo murino de la EA.

En primer lugar, considerando que la EA afecta especialmente a las funciones cognitivas, se evaluó la memoria espacial de ratones PDAPP-J20 de 8 meses de edad, que modelizan etapas sintomáticas de la EA, y el efecto de un tratamiento corto con MET sobre dicho parámetro. Se realizó la prueba de NOL que evalúa la capacidad de los ratones de identificar un objeto relocalizado (O2) (Fig. 7A). Nuestros resultados muestran que durante la sesión de entrenamiento, momento en el cual la memoria aún no se formó, todos los grupos experimentales exploraron el objeto que luego sería relocalizado un porcentaje de tiempo que no difiere del 50% del tiempo total de exploración, lo cual indica que no hubo preferencia por ninguno de los objetos (Figura 7B). Durante la sesión de evaluación, se observó en los ratones NTg una preferencia por el objeto relocalizado, es decir, lograron formar una memoria espacial; mientras que los animales Tg inyectados con vehículo no lo hicieron. Los ratones Tg tratados con MET, mostraron una preferencia significativa por el O2 en la sesión de evaluación (Figura 7C). Estos resultados sugieren que el tratamiento con MET logra revertir el deterioro cognitivo en los animales Tg, medido con la prueba específica de NOL.

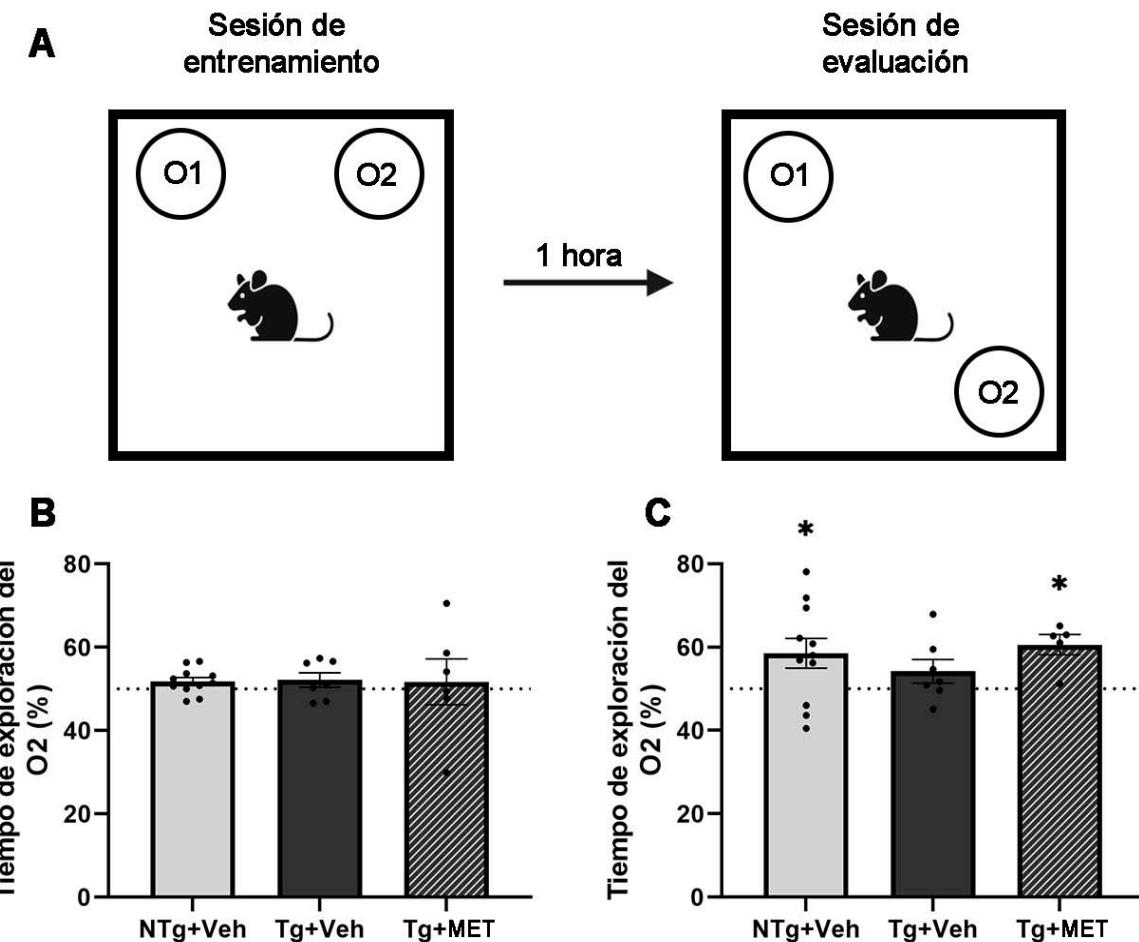


Figura 7. El tratamiento con metformina revierte el deterioro cognitivo en los animales Tg, a nivel de memoria espacial. (A) Esquema del diseño experimental de la prueba de NOL, donde se representa al objeto 2 (O2) como aquel que se relocaliza en la sesión de evaluación. **(B)** Tiempo de exploración del O2 medido porcentualmente respecto del tiempo total de exploración durante la sesión de entrenamiento. **(C)** Tiempo de exploración del O2 medido porcentualmente respecto del tiempo total de exploración durante la sesión de evaluación. * $p<0.05$ (test de t para una muestra comparando contra una media teórica del 50%)

A nivel histopatológico, se evaluó la presencia de placas amiloides, una de las principales características de la EA. Para ello, se realizó una tinción con rojo Congo, que permite identificar específicamente los depósitos amiloides, sobre cortes coronales conteniendo hipocampo (Figura 8A). Pudimos observar que la

carga amiloide (expresada como el porcentaje del área hipocampal cubierta de placas) muestra una disminución apreciable, aunque no significativa, con el tratamiento con MET (Figura 8B). Como la naturaleza de esta reducción podría deberse al cambio de distintos parámetros como lo son el número o el tamaño de las placas, proseguimos a realizar la medición de los mismos. Al evaluar el número de placas amiloides presentes, observamos una reducción apreciable con el tratamiento con MET (Figura 8C). Al evaluar el tamaño de las placas observamos que los animales tratados con MET presentan placas más grandes (Figura 8D). En su conjunto, estos resultados evidencian que el tratamiento con MET podría estar reduciendo el número de las placas a costa de eliminar las de menor tamaño.

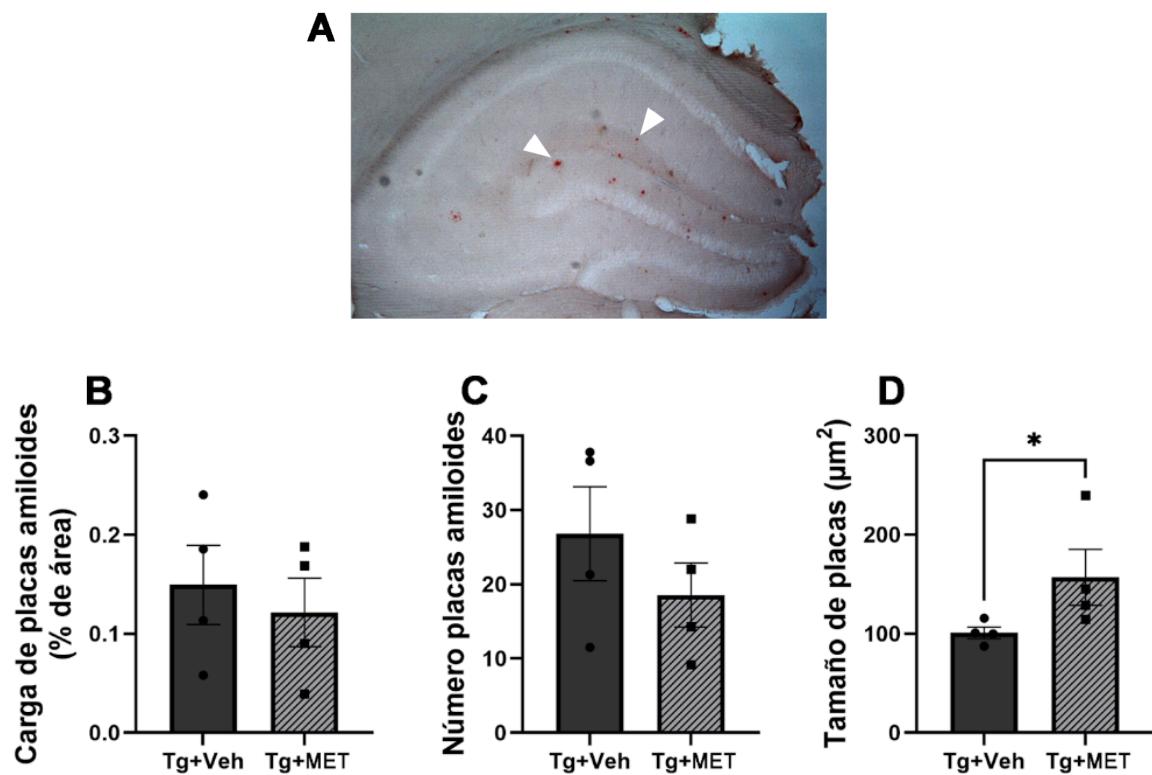


Figura 8. El tratamiento con metformina muestra una tendencia a la disminución de la patología amiloide en el hipocampo de ratones Tg. (A) Imagen representativa obtenida por microscopía óptica de cortes de cerebros procesados para la tinción con rojo Congo, que marca los depósitos amiloides (puntas de flecha). (B) Carga de placas amiloides medidos como porcentaje de área hipocampal positiva para rojo Congo. Se evaluó además el tamaño promedio (C) y número (D) de placas amiloides presentes en el hipocampo. *p<0,05 (Test de t para dos muestras, a una cola).

En su conjunto, estos resultados nos indican que el tratamiento con MET genera no solo una mejora sobre el desempeño cognitivo de los ratones Tg, sino que puede estar induciendo una mejora sobre la patología amiloide.

El tratamiento con metformina revierte el impacto de la EA sobre la microglía.

Las células microgliales presentan signos tempranos de activación en pacientes con EA y modelos experimentales. Para evaluar el estado de la microglía, utilizamos el marcador Tmem19, el cual permite identificar células microgliales que se encuentran en un estado homeostático (Figura 9A). Observamos que los ratones NTg presentan una señal positiva para este marcador en el 19,38% del área total del hipocampo. En los ratones Tg tratados con vehículo este parámetro se reduce aproximadamente a la mitad. Esta disminución de la señal se revierte significativamente con el tratamiento con MET, alcanzando incluso los niveles observados en los animales NTg (Figura 9B, izquierda). De manera complementaria, evaluamos la densidad óptica (DO) para Tmem19 como otra medida del estado homeostático de la microglía. Tomando como referencia el grupo de animales NTg, pudimos observar que en los ratones Tg la DO del marcador disminuye significativamente y que al ser tratados con MET se observa una tendencia a la recuperación, no siendo diferente en términos estadísticos al grupo control (Figura 9B, derecha). Estos resultados evidencian que el modelo murino de EA presenta una disminución de su microglía homeostática, y que esto se revierte con el tratamiento con MET.

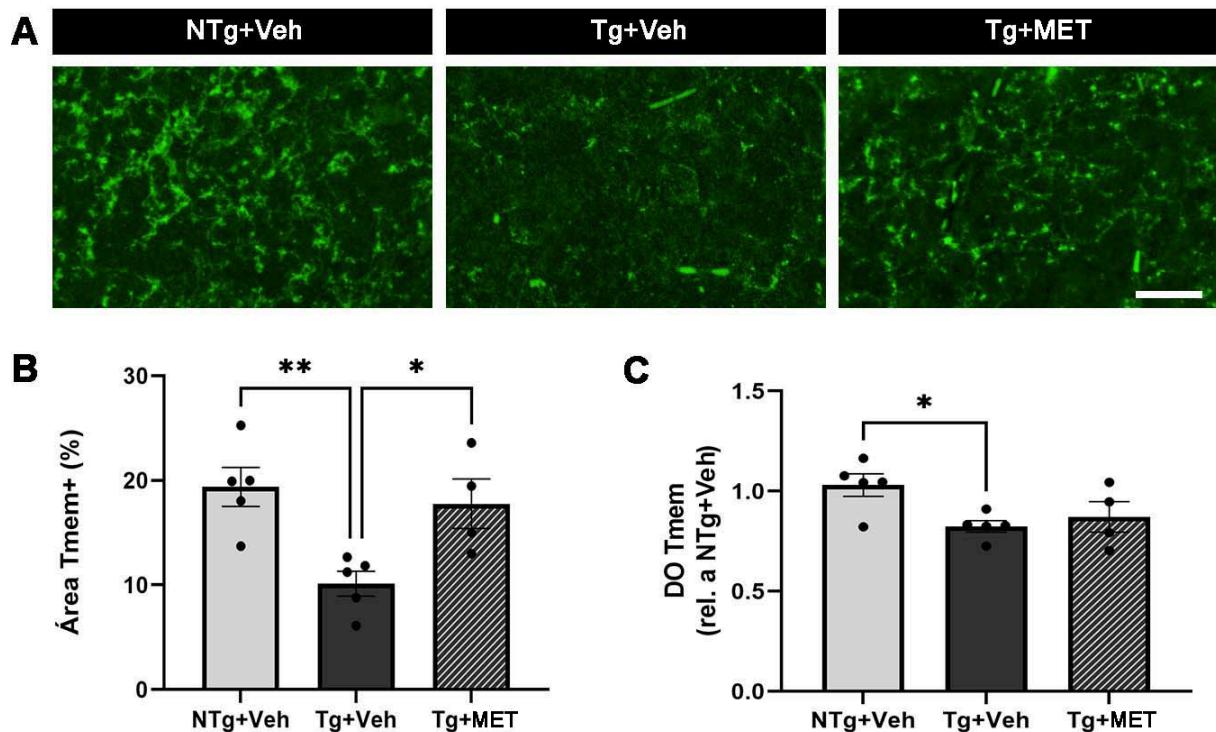


Figura 9. Los ratones Tg presentan menor reactividad para el marcador microglial Tmem119, que se revierte con el tratamiento con metformina. **(A)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia del marcador microglial Tmem obtenidas mediante microscopía confocal, sobre el giro dentado de ratones NTg, o Tg tratados con vehículo o metformina. La barra de escala corresponde a 70 μ m. **(B)** Cuantificación del porcentaje del área del campo positiva para Tmem. **(C)** Cuantificación de la densidad óptica de Tmem por campo. *p<0,05; **p<0,01 (ANOVA de una vía seguido por comparaciones de Tukey).

En función de resultados obtenidos en nuestro laboratorio que indican que la autofagia microglial es disfuncional en la patología, y sabiendo que la activación persistente de las células microgliales se encuentra asociada a cambios en el metabolismo celular, decidimos evaluar el estado de la autofagia en este tipo

celular. En este caso, realizamos una doble inmunofluorescencia contra Tmem19 y p62, un marcador de autofagosomas, a fin de evaluar el flujo autofágico en la microglía (Figura 10A). Los ratones NTg mostraron un 22% del área de Tmem con presencia de autofagosomas, mientras que en los ratones Tg tratados con vehículo correspondió al 34,5%, lo que representa un aumento significativo de la señal. Este resultado evidencia que los animales Tg presentan una acumulación de autofagosomas en la microglía, lo cual sería compatible con un escenario de bloqueo en el flujo autofágico. Pudimos observar que tal acumulación de autofagosomas retorna a los niveles normales cuando los ratones Tg son tratados con MET (Figura 10B).

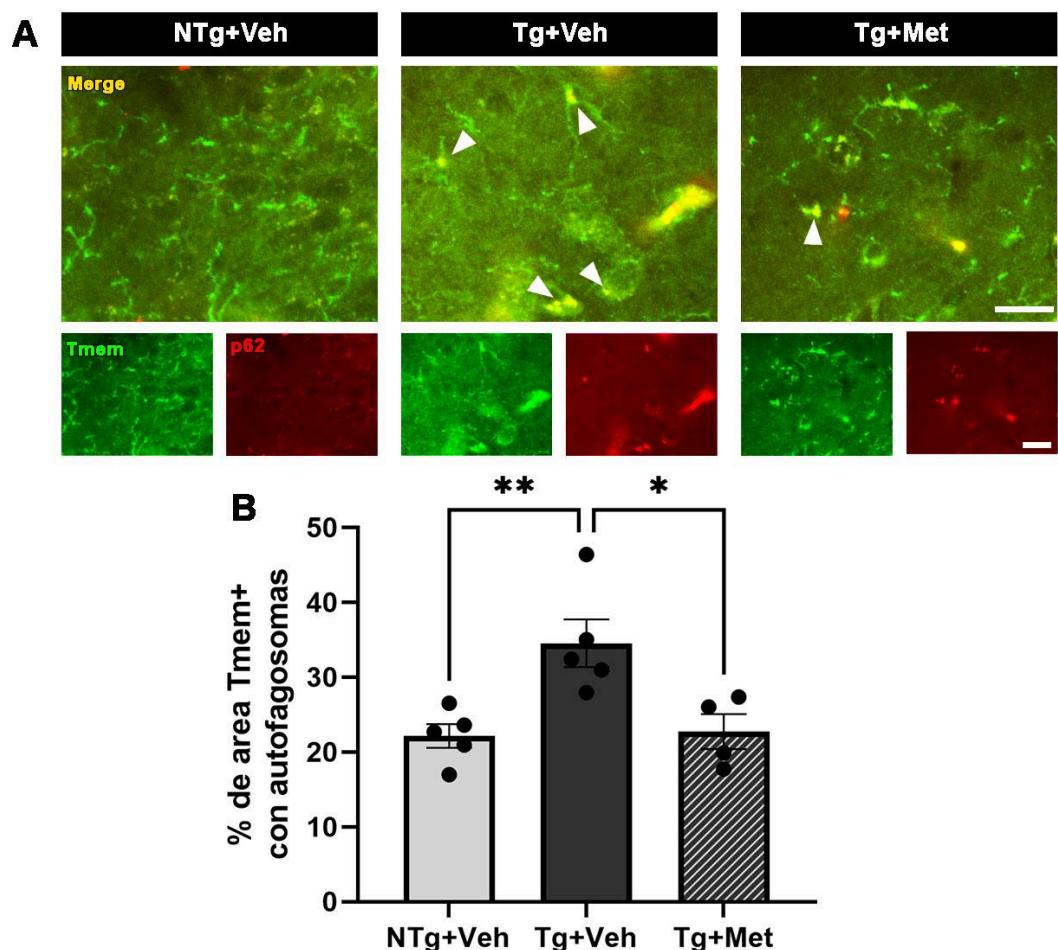


Figura 10. Metformina revierte la acumulación de autofagosomas en la microglía. (A) Fotos representativas de microscopía confocal para la inmunofluorescencia contra el marcador microglial Tmem (verde) y el marcador de autofagosomas p62 (rojo) evidenciando acumulación de autofagosomas en microglía, sobre todo en ratones Tg+Veh (puntas de flecha). Los *insets* muestran los canales rojo y verde por separado. La barra de escala corresponde a 50 μ m. (B) Cuantificación del área Tmem+ que además

colocaliza con p62. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ (ANOVA de una vía seguido por comparaciones de Tukey).

Estos resultados muestran no solo el impacto de la EA sobre el estado de las células microgliales y su impedimento funcional, sino también que el tratamiento con metformina revierte tales efectos adversos.

Puesta a punto y selección de las condiciones para evaluar el efecto de metformina en células microgliales.

Con el objetivo de modelar un contexto asociado a la EA y su tratamiento con MET, se utilizaron células de la línea celular derivada de microglía murina BV2, que se expusieron a A β_{42} y/o MET. Inicialmente, se realizó una puesta a punto a fin de encontrar condiciones de trabajo que no produzcan efectos nocivos *per sé* sobre las células. Se realizaron ensayos de viabilidad por reducción de MTT para dos concentraciones de A β_{42} (principal componente de las placas amiloides), previamente seleccionadas por bibliografía, durante 24 hs para simular una exposición prolongada a estos péptidos, en línea con un estado sintomático de la EA. Pudimos observar que las células microgliales cultivadas en presencia de A β 0,05 μ M no presentan una disminución significativa de su viabilidad, mientras que sí sucede al incubarse con una concentración de 0,5 μ M de A β (Figura 11A). Luego, evaluamos la viabilidad celular con dos concentraciones de MET (seleccionadas por bibliografía) y dos tiempos de exposición diferentes. Pudimos observar que la única condición de exposición a MET que no produce un efecto negativo en la viabilidad celular se corresponde con la concentración de 0,2 mM y un tiempo de exposición de 1 hora (Figura 11B).

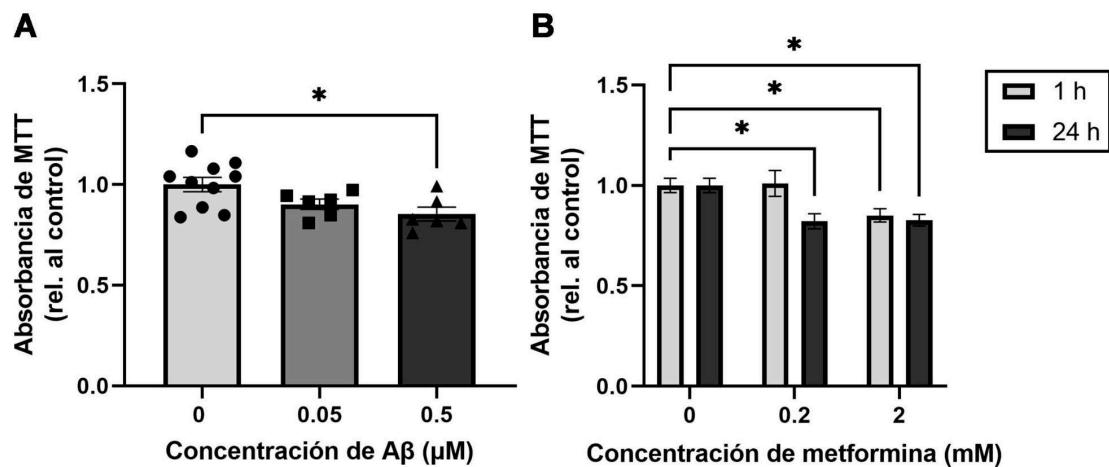


Figura 11. Puesta a punto de las condiciones de exposición a péptidos amiloideos y del tratamiento con metformina en células microgliales BV2. (A) Se realizó un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad a nivel mitocondrial exponiendo a las células durante 24 hs a péptidos A β fibrilizados a una concentración de 0, 0,05 o 0,5 μ M. *p<0,05 (ANOVA de una vía seguido por comparaciones de Tukey). **(B)** El mismo ensayo de viabilidad fue realizado exponiendo las células microgliales a metformina 0,2 o 2 mM durante 1 o 24 hs. *p<0,05 (ANOVA de dos vías seguido por comparaciones de Dunnett).

Si bien estos resultados nos sugieren que las condiciones establecidas no afectan la viabilidad celular, hay que tener en cuenta que el ensayo de MTT se fundamenta en la medición de la actividad mitocondrial, el cual es un parámetro que podría verse influenciado directamente por la acción de MET, aunque esto no se traduzca necesariamente en una menor viabilidad. Para complementar este estudio, realizamos una tinción con ioduro de propidio (IP), un ensayo de viabilidad basado en la integridad de las membranas celulares (Figura 12). Utilizando las condiciones establecidas en el experimento anterior, pudimos confirmar que las condiciones establecidas para A β y MET, no producen diferencias significativas sobre la viabilidad celular (Figura 12B). De esta manera, concluimos que el tratamiento conjunto o independiente con A β 0,05 μ M por 24 hs y metformina 0,2 mM por 1 h no afecta a la sobrevida de células microgliales BV2 en nuestras condiciones de uso.

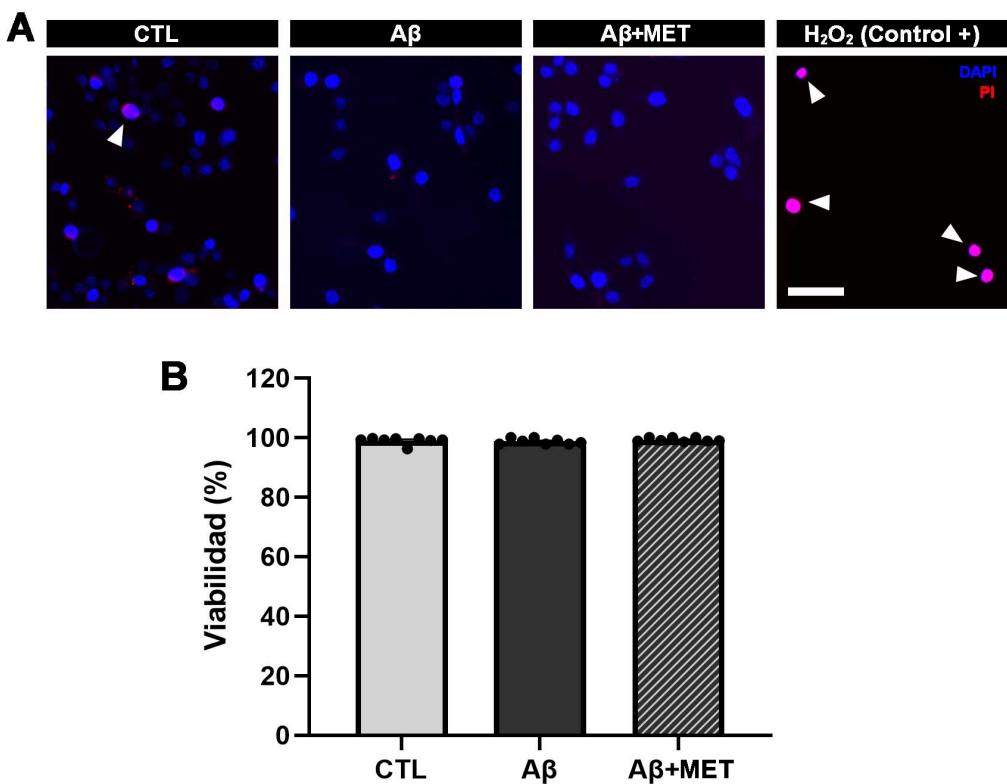


Figura 12. Las condiciones establecidas para el tratamiento de las células BV2 no afectan a su viabilidad. (A) Imágenes representativas de la viabilidad celular medidas en células BV2 mediante una tinción con IP. Los núcleos azules representan núcleos de células marcados con DAPI. En rojo se muestra la señal de IP. Las células que muestran colocalización de ambas marcas son representativas de muerte celular (puntas de flecha). La barra de escala corresponde a 30 μ m. **(B)** Cuantificación de la viabilidad celular frente a la exposición con A β 0,05 μ M por 24 horas, tratadas o no con metformina 0,2 mM durante 1 hora. (ANOVA de una vía)

A partir de estos resultados, hemos decidido emplear la condición de exposición a A β 0,05 μ M por 24 hs para evaluar su impacto sobre las alteraciones microgliales que se observan en un contexto de EA, y metformina 0,2 mM por 1 h para analizar su capacidad de revertir dichos cambios.

Metformina revierte el aumento de ROS mitocondriales y el bloqueo del flujo autofágico causado por A β en células BV2.

Numerosas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un contexto oxidativo, que se evidencia por una acumulación de ROS. Para estudiar si metformina es capaz de revertir el estrés oxidativo producido por A β , evaluamos la producción de ROS mitocondriales mediante el uso de la sonda

Mitosox, utilizando las condiciones de incubación puestas a punto en el ítem anterior (Figura 13). Observamos que la exposición de las células BV2 con A β produce un aumento del 35,3% en la generación de ROS mitocondriales respecto al control y que el tratamiento con MET lo revierte a las condiciones basales.

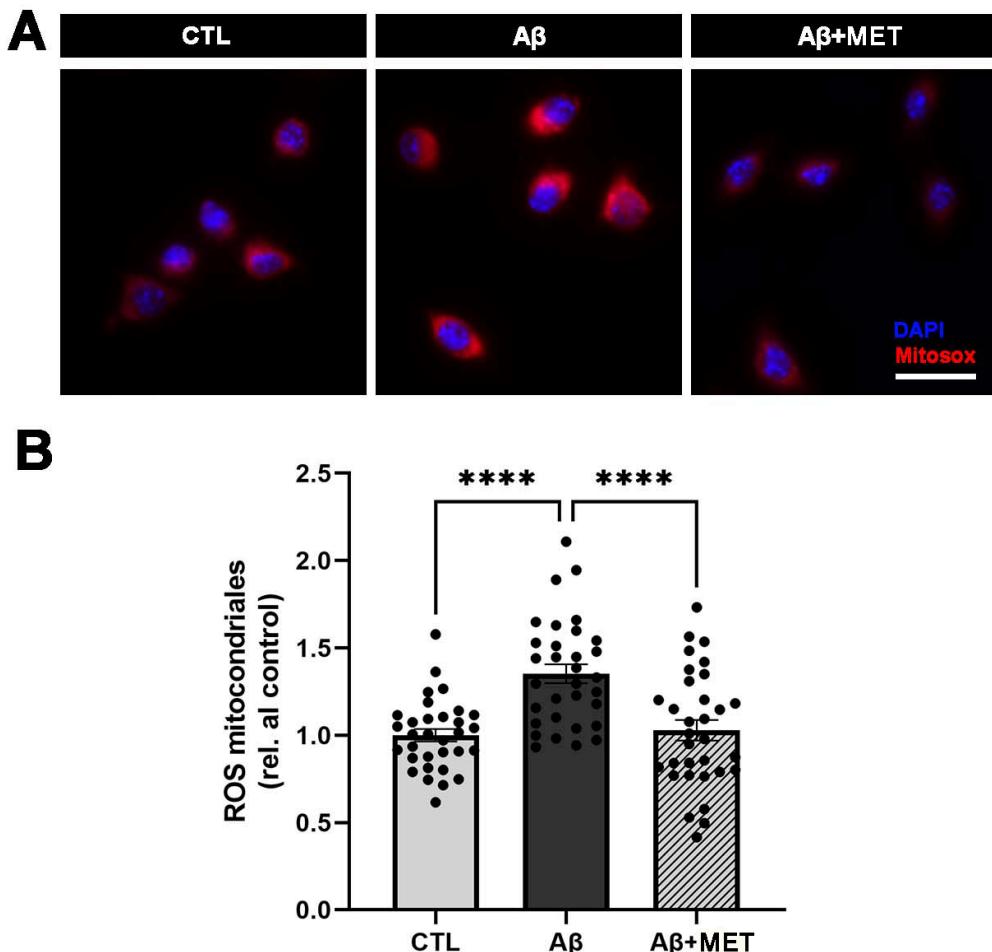


Figura 13. El tratamiento con metformina revierte el aumento en la producción de ROS mitocondriales inducido por A β . (A) Imágenes representativas de ROS mitocondriales medidos en células BV2 mediante la sonda Mitosox. La barra de escala corresponde a 50 μ m. (B) Cuantificación de la densidad óptica por célula. ****p<0,0001 (ANOVA de una vía seguido por comparaciones de Tukey)

Luego, nos propusimos evaluar el flujo autofágico en células BV2 expuestas a A β mediante inmunofluorescencia para el marcador de autofagosomas p62. Como la autofagia es un proceso dinámico que no puede ser evaluado estáticamente, utilizamos el inhibidor de la autofagia Baf-A1 como control de la cantidad de autofagosomas acumulados cuando el flujo autofágico se encuentra impedido (Figura 14A). Pudimos observar en este experimento, que

cuando las células son tratadas con Baf-A1 en ausencia de estímulo, hay un aumento en el área positiva para p62, lo que se traduce en una acumulación de autofagosomas. Esta diferencia pone de manifiesto el flujo autofágico basal, es decir, la cantidad aproximada de autofagosomas que normalmente se degradan en condiciones basales. Cuando las células son tratadas con A β , observamos que Baf-A1 no induce un aumento en la densidad de vesículas p62+, la cual se mantiene en valores mayores a los basales, lo que nos indica que en presencia de A β los autofagosomas no se pueden degradar y por lo tanto el flujo autofágico está impedido. Por último, cuando las células expuestas a A β son tratadas con MET, se observa que hay una baja cantidad de área positiva para p62 respecto de cuando son expuestas únicamente a A β , mientras que al tratar estas células con Baf-A1 la acumulación de autofagosomas aumenta significativamente, lo que indica que en estas condiciones los autofagosomas pueden degradarse exitosamente (Figura 14B).

Estos resultados, demuestran que las condiciones seleccionadas de exposición a A β reproducen el estrés oxidativo y el bloqueo del flujo autofágico que se observan en células microgliales en el contexto de la EA, y que el tratamiento con metformina en las condiciones elegidas revirtió estos cambios.

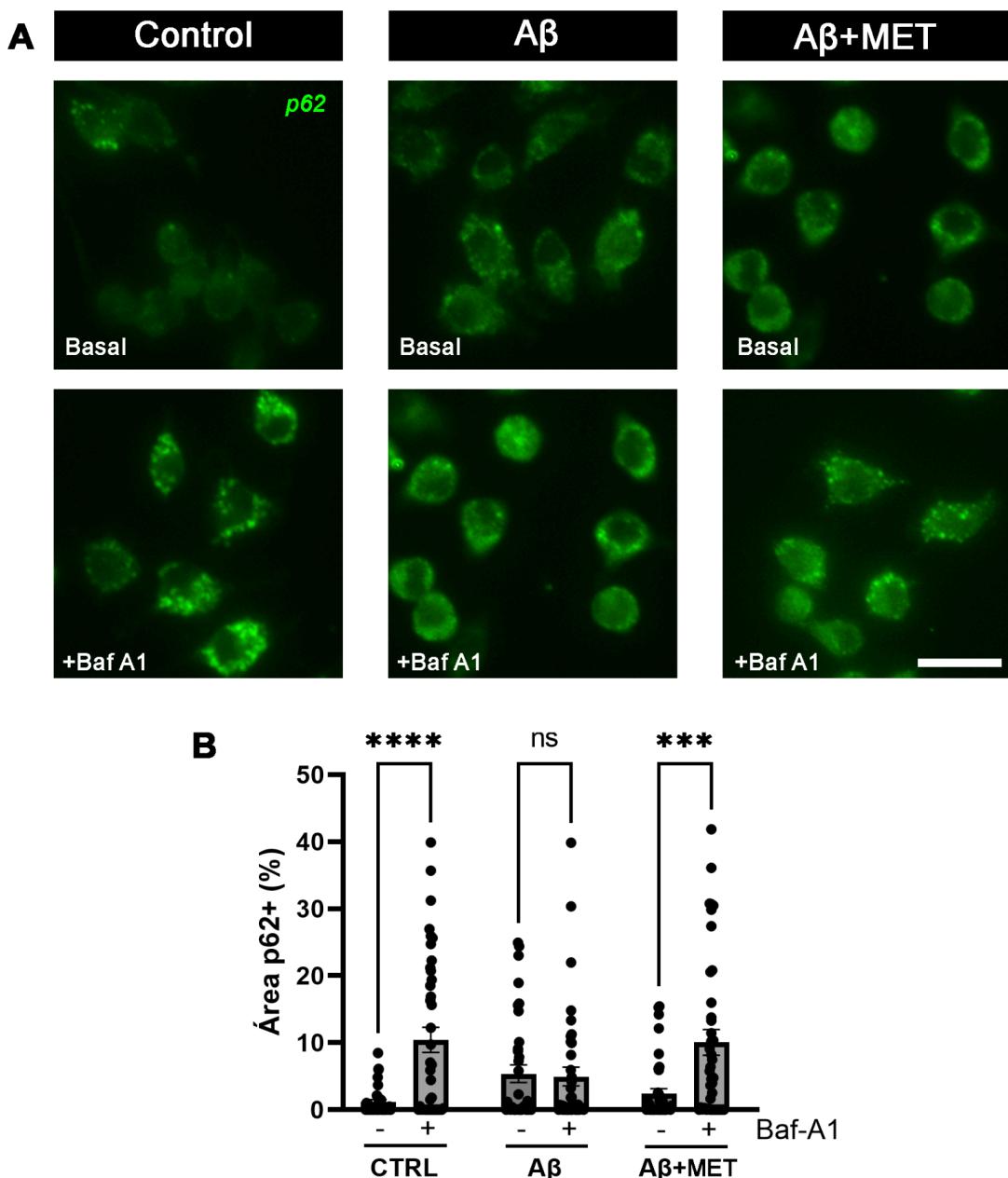


Figura 14. El tratamiento con metformina revierte el bloqueo de la autofagia microglial ocasionado por su exposición a péptidos A β . (A) Imágenes representativas de la acumulación de la señal de p62 para cada tratamiento. La barra de escala corresponde a 20 μ m. (B) Cuantificación del área positiva para p62. ***p<0.01, ****p<0.0001 (ANOVA de dos vías seguido de comparaciones de bonferroni).

Discusión

Discusión

El impacto social y económico producido por la EA es un problema de absoluta gravedad en la actualidad y se prevé que irá en aumento en las próximas décadas. La ausencia de una estrategia terapéutica efectiva para su tratamiento implica un desafío para la comunidad científica, siendo la estrategia de reposicionamiento de drogas una de las propuestas válidas para enfrentarla. En la presente Tesis de Licenciatura, nos propusimos evaluar el rol de MET como una estrategia terapéutica contra la EA. Hemos propuesto como hipótesis de trabajo que MET es capaz de revertir algunas alteraciones que ocurren en estadios sintomáticos de la EA. La misma fue puesta a prueba usando la cepa de ratón transgénico PDAPP-J20, un modelo validado de la enfermedad, y la línea de células microgliales BV2. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con MET causó una mejora en el desempeño cognitivo y una reducción en los rasgos histopatológicos de los ratones, mientras que los experimentos *in vitro* arrojaron resultados preliminares que validan un potencial rol terapéutico del uso de MET a través de la modulación del estrés oxidativo y el flujo autofágico microglial. En su conjunto, estos resultados nos llevan a confirmar en líneas generales la hipótesis de trabajo. Sin embargo, deben ser considerados diferentes aspectos experimentales y limitaciones, las cuales se discutirán a continuación.

Modelo de EA empleado

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo*, sugieren que MET ejerce un efecto protector sobre la performance cognitiva de los ratones Tg de 9 meses de edad y sobre distintos aspectos de la biología subyacente de la enfermedad, evidenciándose una mejora en el estado de la microglía y su actividad autofágica, además de una tendencia a la mejora en la patología amiloide. Sin embargo, si bien la cepa de ratones PDAPP-J20 se encuentra validada por la comunidad como un modelo de la EA, debemos destacar que estos animales desarrollan la enfermedad mediante la sobreproducción de A β al expresar el gen de APP humano, modelando de esta manera la amiloidogénesis con una mutación asociada a la EA familiar. Este aspecto genera ciertas controversias ya que, al tratarse de una enfermedad esporádica y multifactorial,

no podemos asegurar que la sobreproducción de A β únicamente sea una manera fiable de representarla. Por otro lado, al desconocer el origen de la EA, no podemos asegurar que la acumulación de A β es la causa de que la patología se desarrolle, o si es simplemente un marcador de la misma, siendo este un cuestionamiento ampliamente debatido por los detractores de la hipótesis de la cascada amiloide (Drummond & Wisniewski 2017; Kepp, Robakis et al. 2023). Sin embargo, es importante mencionar que en este modelo se constata un cuadro neuroinflamatorio con participación de la glía de inicio temprano así como alteraciones comportamentales. A pesar de las controversias que puede generar la utilización de estos modelos de estudio, es clave destacar la imposibilidad de representar en animales una enfermedad multifactorial y esporádica como lo es la EA, por lo que los modelos existentes, con sus limitaciones, han sido hasta el momento la mejor herramienta para llevar a cabo los avances en las investigaciones sobre esta enfermedad.

Efectos de metformina dependientes del sexo

Como primer objetivo específico de esta Tesis de Licenciatura, nos propusimos evaluar el impacto de MET sobre el deterioro cognitivo, la patología amiloide y el funcionamiento de la microglía en un modelo *in vivo* de la EA. Ou y colaboradores, utilizando ratones de la cepa APP/PS1 encontraron que el tratamiento con MET previene el deterioro de su memoria, la formación de depósitos amiloideos y la activación crónica de microglía y astrocitos, además de promover la neurogénesis (Ou, Kong et al. 2018). Utilizando el mismo modelo murino, Chen y colaboradores probaron que el tratamiento con MET reduce tanto la patología amiloide como la agregación de tau, asociándose con un incremento en la capacidad de la microglía de degradar el A β (Chen, Zhao et al. 2021). Es importante destacar que ambos grupos utilizaron ratones hembra. Diversos estudios mostraron un efecto de MET dependiente del sexo, observando que generalmente los efectos positivos se observaban más claramente en hembras, mientras que los machos solían mostrar un menor efecto, ausencia de efecto o incluso efectos negativos asociados al tratamiento con metformina (DiTacchio, Heinemann et al. 2015).

En nuestro trabajo, hemos decidido trabajar preliminarmente con ratones macho aún conociendo estos antecedentes, debido a la disponibilidad de animales con los que contábamos en nuestra colonia del bioterio. Para ello partimos de la suposición de que si lográbamos encontrar un efecto en ratones macho, a futuro sería más factible encontrar un efecto similar o mayor en hembras, de acuerdo a los antecedentes. Por otro lado, este diseño experimental nos permitiría comparar el efecto del tratamiento con MET con otras estrategias experimentales similares que están siendo evaluadas en nuestro laboratorio empleando ratones de la misma edad y sexo, en el marco de otras líneas de investigación. En el presente trabajo, encontramos que el tratamiento con el agente normoglucemiante MET, además de revertir diferentes rasgos histopatológicos de la enfermedad, efectivamente es capaz de mejorar el estado cognitivo de los animales Tg.

Efectos de metformina dependientes de sus condiciones de administración

Si bien existen diversos estudios que muestran el efecto beneficioso de MET, existen otros en los que se encontraron efectos adversos con el uso del fármaco. Comparando los trabajos, se puede observar una gran variabilidad en cuanto a las dosis utilizadas, las vías de administración empleadas y la duración de los tratamientos para llevar a cabo los experimentos. En la bibliografía, se encuentran antecedentes de un rango amplio de concentraciones de MET utilizadas en animales, que van desde 200 a 700 mg/kg, administradas mediante inyección intraperitoneal o en el agua bebida entre 2 semanas y hasta varios meses (Picone, Vilasi et al. 2016; Ou, Kong et al. 2018; Chen, Zhao et al. 2021). Está descrito además, que la exposición prolongada a MET puede promover la vía amiloidogénica, inducir vías no canónicas de señalización, y promover la apoptosis neuronal (Picone, Vilasi et al. 2016). Puede suponerse con todas estas observaciones que los resultados contradictorios se deben en parte a la gran heterogeneidad en la administración de MET.

En este estudio no se incluyen animales NTg que hayan recibido MET. Esto se debe a que, en parte, la seguridad de la administración de metformina ha sido verificada en los respectivos ensayos clínicos y tras décadas de uso en la

clínica. Sin embargo, nuestro grupo cuenta con resultados preliminares (en el marco de otras líneas de investigación) que sugieren que el tratamiento con MET en animales NTg no solamente no tiene efectos deletéreos sino que incluso puede generar una mejora en ausencia de patología. Esto podría indicar que metformina no solo podría revertir procesos patológicos, sino incluso algunos de los cambios negativos que subyacen al proceso de envejecimiento fisiológico. En este sentido, algunos autores sostienen que metformina podría ser considerada como una droga antienvejecimiento, y de esa manera disminuiría la severidad de enfermedades asociadas a la edad, como la EA (Kulkarni, Gubbi et al. 2020). Nuestro laboratorio se encuentra actualmente iniciando una línea de investigación en este sentido.

Por otro lado, la mayoría de los estudios que trabajan con modelos *in vitro* de administración de MET utilizan dosis supra fisiológicas, alejándose de los potenciales efectos del fármaco para el tratamiento en pacientes. Siguiendo un esquema de administración como el efectuado por Ou, nuestro grupo realizó una puesta a punto de las condiciones de administración de MET en ratones, utilizando concentraciones relativamente bajas respecto a lo observado en la bibliografía y reduciendo la cantidad de dosis administradas, aproximándonos lo más posible a la dosis semanal que ingiere un paciente diabético. En este trabajo, obtuvimos una mejora en diferentes rasgos de la histopatología de la enfermedad, junto con un mejor desempeño cognitivo de los animales tratados con MET, aún utilizando dosis y tiempos de administración más cortos que los encontrados en la bibliografía.

Por otro lado, en modelos *in vitro*, se observó que la exposición directa de células en cultivo produce la activación de la vía de AMPK a concentraciones de MET menores de 50 μ M, mientras que al utilizar concentraciones entre los 2 y 5 mM se produce la inhibición muy marcada del complejo 1 de la cadena respiratoria, asociado a efectos detinentales (Zhou, Myers et al. 2001; Cao, Meng et al. 2014). Además, las altas concentraciones y los tiempos prolongados de exposición pueden estar mediando efectos independientes de la activación de la vía de AMPK, e incluso efectos tóxicos por parte del fármaco, lo que puede

llevar a resultados clínicamente irrelevantes y que incluso podrían estar enmascarando las principales vías de activación de MET (He & Wondisford 2015).

Todas estas observaciones evidencian la necesidad de ensayar distintas condiciones *in vitro* para seleccionar las óptimas. Con la finalidad de encontrar una concentración y un tiempo de exposición de MET que no afecte la viabilidad celular y que a su vez sea capaz de generar un efecto apreciable sobre diferentes aspectos que involucren la biología de la EA, nos propusimos como Objetivo específico 2 realizar una puesta a punto de las condiciones de exposición de las células microgliales a A β y/o a MET. Como primer paso, evaluamos la exposición durante dos tiempos (1 o 24 horas) y a dos concentraciones bajas de MET, una de uso común en la bibliografía (2 mM) y una concentración menor, la cual se corresponde con dosis que según la bibliografía son capaces de ejercer los efectos de MET sobre la vía de AMPK (0,2 mM). Por otro lado, el uso de A β_{42} para modelar un contexto patológico crónico puede resultar letal para las células debido a su toxicidad, si no es administrado en las condiciones adecuadas. En este caso, decidimos evaluar su efecto por un tiempo de exposición de 24 horas, el cual nos permite simular una exposición prolongada de las células al A β . Además, evaluamos dos concentraciones bajas del péptido, una comprobada previamente por nuestro grupo (0,5 uM) y otra que se asemeja en mayor medida al contexto fisiopatológico en el que se encuentran las células durante la EA (0,05 uM).

En esta Tesis, pudimos verificar que algunas de las condiciones de exposición a MET que se utilizan en trabajos publicados, generan una disminución de la viabilidad en nuestras condiciones de trabajo. Esta puesta a punto nos permitió definir una condición de trabajo que, sin afectar la viabilidad de las células microgliales, permite evaluar el efecto de MET en un contexto de la EA. Además, estas condiciones serán utilizadas para describir posteriormente otros efectos del tratamiento y los mecanismos involucrados, como la activación microglial o la capacidad de la microglía activada de producir daño neuronal.

Efectos de metformina dependientes del tipo celular

Si bien el objetivo del reposicionamiento de drogas sobre la EA implica la búsqueda de un efecto neuroprotector, es importante contemplar que en el organismo las células neuronales están en íntima interacción física y química con otros tipos celulares, los cuales podrían estar mediando diversos efectos sobre las neuronas, implicando por sí mismas blancos terapéuticos contra la neurodegeneración. A su vez, se observó que la estimulación directa de neuronas con MET favorece la síntesis y agregación de péptidos amiloïdes y Tau (Chen, Zhou et al. 2009; Picone, Nuzzo et al. 2015; Barini, Antico et al. 2016). Estos resultados muestran un efecto adverso de MET, el cual no se corresponde con la evidencia en favor del uso de este fármaco en experimentos *in vivo*, reforzando la idea del potencial rol protector que ejerce el entorno neuronal sobre las neuronas.

Un trabajo realizado por Festa y colaboradores describe un mecanismo según el cual la respuesta inflamatoria de la microglía induce un bloqueo de la autofagia neuronal, promoviendo la acumulación de proteínas mal plegadas, y concluyendo que este mecanismo podría ser común a varias enfermedades neurodegenerativas donde se acumulan proteínas en neuronas (Festa, Siddiqi et al. 2023). Este trabajo sugiere que el funcionamiento defectivo de la microglía tiene un rol crucial en estas enfermedades, por lo que modular su actividad puede efectivamente cambiar el curso de las mismas. Basándonos en todos estos trabajos, en esta tesis nos centramos en el estudio de la microglía por su capacidad de responder a MET, y por el rol clave que se le ha atribuido en los últimos años sobre el desarrollo de la EA (Merighi, Nigro et al. 2022).

Debido a que el daño que ocurre en el contexto de la EA puede incluir el debilitamiento de la BHE, pudiendo resultar en un consecuente ingreso al SNC de monocitos y macrófagos circulantes que son Iba1+, nos resultó clave utilizar un marcador específico de microglía como Tmem19, evitando de esta manera una posible marcación inespecífica de macrofagos que pudieron haber llegado al tejido cerebral. Esta Tesis marcó además el punto de partida para la puesta a punto de este nuevo marcador microglial en el laboratorio, permitiendo obtener herramientas más específicas para el estudio de estas células a nivel histológico. Por otro lado, el marcador Tmem19 al marcar de una manera efectiva los

procesos celulares, nos permite diferenciar de una manera clara la morfología homeostática de la microglía, y eventualmente la acumulación de vesículas autofágicas en estas estructuras. A nivel histológico, pudimos observar que en el hipocampo de los ratones Tg la microglía presenta una morfología general asociada a un estado reactivo de la misma, en términos de Tmem19, que se revierte a uno homeostático con la administración de MET. Este resultado puede deberse a que el tratamiento con MET promueve el pasaje de un estado reactivo de la microglía a uno homeostático, o a que haya un aumento en el número total de células microgliales que se refleje en una mayor cantidad de microglía homeostática. Un estudio realizado por nuestro grupo encontró que los ratones Tg de la cepa PDAPP-J20 muestran un aumento en la cantidad de células microgliales reactivas, evidenciadas por la inmunotinción de iba1, además de un mayor número de células reactivas con la edad (Pomilio, Pavia et al. 2016). Nuestro resultado nos lleva a pensar que el aumento de la microglía homeostática se debe a una conversión desde un estado reactivo, pero ignorando si este efecto se produce sobre una mayor cantidad de células. Esto podría esclarecerse realizando un experimento complementario en el que se evalúe en los cortes obtenidos de los distintos grupos de animales el número de células Iba1+ (marcador de microglía reactiva) y de Tmem19 (marcador de microglía homeostática).

Otro resultado interesante obtenido en esta Tesis de Licenciatura fue la reducción de los niveles de ROS en las células BV2 expuestas a A β tratadas con MET. Numerosas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un contexto oxidativo como consecuencia de una disfunción mitocondrial generalizada, que se evidencia por una acumulación de ROS. Además, existen estudios que sugieren que la sobreproducción de ROS es una consecuencia de la acumulación de péptidos A β que facilitan la disfunción mitocondrial (Zhao & Zhao 2013; Tonries & Trushina 2017; Cheignon, Tomas et al. 2018). Por otro lado, se conoce que la inhibición de mTOR promueve la biogénesis mitocondrial (Morita, Gravel et al. 2013). Conociendo por medio de nuestros resultados que MET es capaz de revertir la acumulación de ROS causada en este modelo de la EA, resta dilucidar si tal efecto se debe a una mejora en el funcionamiento mitocondrial, que podría estar ocurriendo como consecuencia de la inhibición de mTOR, o debido a

que el fármaco promueve la eliminación de mitocondrias disfuncionales mediante la inducción de la autofagia.

Efectos de metformina sobre la autofagia microglial

La autofagia es una vía degradativa crítica para la eliminación de organelas y de proteínas tóxicas y propensas a agregarse. En las enfermedades neurodegenerativas, este proceso se encuentra afectado, de manera que la eliminación de proteínas defectuosas se encuentra impedida. La autofagia neuronal se encuentra bien descrita como un proceso clave en el desarrollo y la función de las neuronas (Stavoe & Holzbaur 2019), sin embargo el rol de la autofagia en células gliales ha sido menos estudiado aunque ha despertado el interés de la comunidad en los últimos años. Por ejemplo, Cheng y colaboradores encontraron que la deficiencia en la autofagia microglial es suficiente para provocar un aumento de la neuroinflamación y síntomas similares a los de la enfermedad de Parkinson en ratones (Cheng, Liao et al. 2020). Este resultado evidencia el rol fundamental de la microglía en el correcto funcionamiento neuronal, por lo que estudiar la autofagia microglial adquiere una relevancia fundamental como blanco terapéutico contra las enfermedades neurodegenerativas.

Estudios previos realizados por nuestro grupo reportaron que en ratones PDAPP-J20 de 9 meses de edad se observa una acumulación de autofagosomas, lo cual se asocia a un bloqueo de la autofagia (Pomilio, Gorojod et al. 2020). En el presente trabajo no sólo constatamos la acumulación de autofagosomas en los ratones Tg, sino que encontramos un efecto restaurador en los animales tratados con MET. Por otro lado, observamos en las células BV2 que la acumulación de autofagosomas que ocurre en respuesta al A β se revierte al administrarles MET. Estos resultados indican que MET es capaz de revertir el deterioro sobre el proceso autofágico que ocurre en el contexto de la EA. Por otro lado, hemos podido reflejar el mismo fenómeno tanto en los modelos *in vivo* como *in vitro*, reforzando la importancia de estos cambios en la patofisiología de la EA.

Como siguiente etapa en esta línea de investigación, se plantea evaluar las implicancias funcionales de la restauración en el flujo autofágico microglial y su impacto en otras funciones microgliales. Es probable que al restaurar su capacidad degradativa, la microglía esté pudiendo eliminar exitosamente agregados de A β internalizados, lo cual explicaría en parte la disminución en el número de placas pequeñas que hemos observado en el modelo *in vivo*. Por otro lado, dada la interrelación entre la autofagia microglial y la activación de la respuesta inflamatoria, es posible que la restauración del flujo autofágico también implique la inducción de un menor tono inflamatorio, y por lo tanto un contexto menos dañino para las neuronas. Todos estos puntos serán objeto de estudio durante la continuación de esta línea de investigación.

Conclusión

En su conjunto, los resultados de la presente Tesis de Licenciatura aportan evidencia robusta sobre la capacidad de MET para revertir diferentes alteraciones características de la EA, haciendo énfasis en el deterioro cognitivo y en parámetros microgliales, como su reactividad y la autofagia. Por su parte, la puesta a punto de las condiciones de trabajo *in vitro* empleando células BV2, nos permitirá continuar esta línea de investigación profundizando sobre aspectos que consideramos relevantes a la hora de estudiar la EA, como lo son la expresión de citoquinas proinflamatorias por parte de la microglía y el rol de la autofagia en la degradación de A β . Consideramos que los resultados obtenidos en este trabajo son de relevancia para futuras investigaciones que implican, bajo la estrategia de reposicionamiento de drogas, el uso de MET como potencial tratamiento contra la EA.

Bibliografía

Bibliografía

- A Armstrong R. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia neuropathologica*, 57(2), 87–105.
- Al-Ghraiyyah, N. F., J. Wang, A. E. Alkhalifa, A. B. Roberts, R. Raj, E. Yang and A. Kaddoumi (2022). "Glial Cell-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's Disease." *Int J Mol Sci* 23(18).
- Alzheimer's Disease International (2015) World Alzheimer Report: The global Impact of dementia.
- Alzheimer's Association. (2021). "2021 Alzheimer's disease facts and figures." *Alzheimers Dement* 17(3): 327-406.
- Alzheimer's Association. (2023). "2023 Alzheimer's disease facts and figures." *Alzheimers Dement* 19(4): 1598-1695.
- Ashburn, T. T. and K. B. Thor (2004). "Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs." *Nat Rev Drug Discov* 3(8): 673-683.
- Bai, B. and H. Chen (2021). "Metformin: A Novel Weapon Against Inflammation." *Front Pharmacol* 12: 622262.
- Bailey, C. J. (2017). "Metformin: historical overview." *Diabetologia* 60(9): 1566-1576.
- Barini, E., O. Antico, Y. Zhao, F. Asta, V. Tucci, T. Catelani, R. Marotta, H. Xu and L. Gasparini (2016). "Metformin promotes tau aggregation and exacerbates abnormal behavior in a mouse model of tauopathy." *Mol Neurodegener* 11: 16.
- Beauquis, J., P. Pavia, C. Pomilio, A. Vinuela, N. Podlutskaya, V. Galvan and F. Saravia (2013). "Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease." *Exp Neurol* 239: 28-37.
- Beauquis, J., A. Vinuela, C. Pomilio, P. Pavia, V. Galvan and F. Saravia (2014). "Neuronal and glial alterations, increased anxiety, and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer's disease." *Hippocampus* 24(3): 257-269.
- Bekris, L. M., C. E. Yu, T. D. Bird and D. W. Tsuang (2010). "Genetics of Alzheimer disease." *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23(4): 213-227.
- Bharath, L. P., M. Agrawal, G. McCambridge, D. A. Nicholas, H. Hasturk, J. Liu, K. Jiang, R. Liu, Z. Guo, J. Deeney, C. M. Apovian, J. Snyder-Cappione, G. S. Hawk, R. M. Fleeman, R. M. F. Pihl, K. Thompson, A. C. Belkina, L. Cui, E. A. Proctor, P. A. Kern and B. S. Nikolajczyk (2020). "Metformin Enhances Autophagy and Normalizes Mitochondrial Function to Alleviate Aging-Associated Inflammation." *Cell Metab* 32(1): 44-55 e46.
- Block, M. L. and J. S. Hong (2007). "Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity." *Biochem Soc Trans* 35(Pt 5): 1127-1132.
- Broz, P. and V. M. Dixit (2016). "Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling." *Nat Rev Immunol* 16(7): 407-420.

- Bussi, C., J. M. Peralta Ramos, D. S. Arroyo, E. A. Gaviglio, J. I. Gallea, J. M. Wang, M. S. Celej and P. Iribarren (2017). "Autophagy down regulates pro-inflammatory mediators in BV2 microglial cells and rescues both LPS and alpha-synuclein induced neuronal cell death." *Sci Rep* **7**: 43153.
- Cai, W., T. Wu and N. Chen (2023). "The Amyloid-Beta Clearance: From Molecular Targets to Glial and Neural Cells." *Biomolecules* **13**(2).
- Cao, J., S. Meng, E. Chang, K. Beckwith-Fickas, L. Xiong, R. N. Cole, S. Radovick, F. E. Wondisford and L. He (2014). "Low concentrations of metformin suppress glucose production in hepatocytes through AMP-activated protein kinase (AMPK)." *J Biol Chem* **289**(30): 20435-20446.
- Caponio, D., K. Veverova, S. Q. Zhang, L. Shi, G. Wong, M. Vyhalek and E. F. Fang (2022). "Compromised autophagy and mitophagy in brain ageing and Alzheimer's diseases." *Aging Brain* **2**: 100056.
- Carling, D. (2017). "AMPK signalling in health and disease." *Curr Opin Cell Biol* **45**: 31-37.
- Chang, Y. Y., G. Juhasz, P. Goraksha-Hicks, A. M. Arsham, D. R. Mallin, L. K. Muller and T. P. Neufeld (2009). "Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 1): 232-236.
- Chauhan, P., K. Jethwa, A. Rathawa, G. Chauhan and S. Mehra (2021). The Anatomy of the Hippocampus. *Cerebral Ischemia*. R. Pluta. Brisbane (AU).
- Cheignon, C., M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau and F. Collin (2018). "Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease." *Redox Biol* **14**: 450-464.
- Chen, F., R. R. Dong, K. L. Zhong, A. Ghosh, S. S. Tang, Y. Long, M. Hu, M. X. Miao, J. M. Liao, H. B. Sun, L. Y. Kong and H. Hong (2016). "Antidiabetic drugs restore abnormal transport of amyloid-beta across the blood-brain barrier and memory impairment in db/db mice." *Neuropharmacology* **101**: 123-136.
- Chen, G., K. S. Chen, J. Knox, J. Inglis, A. Bernard, S. J. Martin, A. Justice, L. McConlogue, D. Games, S. B. Freedman and R. G. Morris (2000). "A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease." *Nature* **408**(6815): 975-979.
- Chen, Y., S. Zhao, Z. Fan, Z. Li, Y. Zhu, T. Shen, K. Li, Y. Yan, J. Tian, Z. Liu and B. Zhang (2021). "Metformin attenuates plaque-associated tau pathology and reduces amyloid-beta burden in APP/PS1 mice." *Alzheimers Res Ther* **13**(1): 40.
- Chen, Y., K. Zhou, R. Wang, Y. Liu, Y. D. Kwak, T. Ma, R. C. Thompson, Y. Zhao, L. Smith, L. Gasparini, Z. Luo, H. Xu and F. F. Liao (2009). "Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(10): 3907-3912.
- Chen, Z. Y. and Y. Zhang (2022). "Animal models of Alzheimer's disease: Applications, evaluation, and perspectives." *Zool Res* **43**(6): 1026-1040.
- Cheng, J., Y. Liao, Y. Dong, H. Hu, N. Yang, X. Kong, S. Li, X. Li, J. Guo, L. Qin, J. Yu, C. Ma, J. Li, M. Li, B. Tang and Z. Yuan (2020). "Microglial autophagy defect causes

parkinson disease-like symptoms by accelerating inflammasome activation in mice." *Autophagy* 16(12): 2193-2205.

Chow, E., A. Yang, C. H. L. Chung and J. C. N. Chan (2022). "A Clinical Perspective of the Multifaceted Mechanism of Metformin in Diabetes, Infections, Cognitive Dysfunction, and Cancer." *Pharmaceutics (Basel)* 15(4).

Colonna, M. and O. Butovsky (2017). "Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration." *Annu Rev Immunol* 35: 441-468.

Deng, W., J. B. Aimone and F. H. Gage (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?" *Nat Rev Neurosci* 11(5): 339-350.

Detaille, D., B. Guigas, X. Leverve, N. Wiernsperger and P. Devos (2002). "Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function." *Biochem Pharmacol* 63(7): 1259-1272.

DiTacchio, K. A., S. F. Heinemann and G. Dziewczapolski (2015). "Metformin treatment alters memory function in a mouse model of Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* 44(1): 43-48.

Drummond, E. and T. Wisniewski (2017). "Alzheimer's disease: experimental models and reality." *Acta Neuropathol* 133(2): 155-175.

Eckman, E. A. and C. B. Eckman (2005). "Abeta-degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5): 1101-1105.

Engler, C., M. Leo, B. Pfeifer, M. Juchum, D. Chen-Koenig, K. Poelzl, H. Schoenherr, D. Vill, J. Oberdanner, E. Eisendle, K. Middeldorf, B. Heindl, H. Gaenzer, G. Bode, K. Kirchmeyr, G. Ladner, L. Rieger, U. Koellensperger, A. Schwaiger, F. Stoeckl, G. Zangerl, M. Lechleitner, I. Delmarko, W. Oberaigner, C. Rissbacher, H. Tilg and C. Ebenbichler (2020). "Long-term trends in the prescription of antidiabetic drugs: real-world evidence from the Diabetes Registry Tyrol 2012-2018." *BMJ Open Diabetes Res Care* 8(1).

Festa, B. P., F. H. Siddiqi, M. Jimenez-Sanchez, H. Won, M. Rob, A. Djajadikerta, E. Stamatakou and D. C. Rubinsztein (2023). "Microglial-to-neuronal CCR5 signaling regulates autophagy in neurodegeneration." *Neuron* 111(13): 2021-2037 e2012.

Fink, H. A., E. Jutkowitz, J. R. McCarten, L. S. Hemmy, M. Butler, H. Davila, E. Ratner, C. Calvert, T. R. Barclay, M. Brasure, V. A. Nelson and R. L. Kane (2018). "Pharmacologic Interventions to Prevent Cognitive Decline, Mild Cognitive Impairment, and Clinical Alzheimer-Type Dementia: A Systematic Review." *Ann Intern Med* 168(1): 39-51.

Foretz, M., B. Guigas and B. Viollet (2023). "Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential." *Nat Rev Endocrinol* 19(8): 460-476.

Francois, A., A. Rioux Bilan, N. Quellard, B. Fernandez, T. Janet, D. Chassaing, M. Paccalin, F. Terro and G. Page (2014). "Longitudinal follow-up of autophagy and inflammation in brain of APPswePS1dE9 transgenic mice." *J Neuroinflammation* 11: 139.

- Frayn, K. N., P. I. Adnitt and P. Turner (1971). "The hypoglycaemic action of metformin." Postgrad Med J **47**(554): 777-780.
- Gallardo, G. and D. M. Holtzman (2019). "Amyloid-beta and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease." Adv Exp Med Biol **1184**: 187-203.
- Games, D., D. Adams, R. Alessandrini, R. Barbour, P. Berthelette, C. Blackwell, T. Carr, J. Clemens, T. Donaldson, F. Gillespie and et al. (1995). "Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein." Nature **373**(6514): 523-527.
- Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, I. M. Samokhvalov and M. Merad (2010). "Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages." Science **330**(6005): 841-845.
- Gomez-Nicola, D. and V. H. Perry (2015). "Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity." Neuroscientist **21**(2): 169-184.
- Gui, J., J. Liu, L. Wang, X. Yang, B. Tian, H. Luo, D. Huang, Z. Han, J. Yang, R. Ding, Z. Fang, X. Li, L. Cheng and L. Jiang (2024). "Autophagy alleviates hippocampal neuroinflammation by inhibiting the NLRP3 inflammasome in a juvenile rat model exposed particulate matter." Toxicology: 153730.
- Guo, S., H. Wang and Y. Yin (2022). "Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases." Front Aging Neurosci **14**: 815347.
- Ha J-S, Yeom Y-S, Jang J-H, Kim Y-H, Im JI, Kim IS, Yang SJ. Anti-inflammatory effects of metformin on neuro-inflammation and NLRP3 Inflammasome activation in BV-2 microglial cells. BSL **25**: 92–98, 2019.
- Haines, J. L. (2018). "Alzheimer Disease: Perspectives from Epidemiology and Genetics." J Law Med Ethics **46**(3): 694-698.
- He, L. and F. E. Wondisford (2015). "Metformin action: concentrations matter." Cell Metab **21**(2): 159-162.
- Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." Science **256**(5054): 184-185.
- Heidebrink, J. L. and H. L. Paulson (2024). "Lessons Learned from Approval of Aducanumab for Alzheimer's Disease." Annu Rev Med **75**: 99-111.
- Herrup, K. (2015). "The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis." Nat Neurosci **18**(6): 794-799.
- Kajbaf, F., M. E. De Broe and J. D. Lalau (2016). "Therapeutic Concentrations of Metformin: A Systematic Review." Clin Pharmacokinet **55**(4): 439-459.
- Kamphuis, W., C. Mamber, M. Moeton, L. Kooijman, J. A. Sluijs, A. H. Jansen, M. Verveer, L. R. de Groot, V. D. Smith, S. Rangarajan, J. J. Rodriguez, M. Orre and E. M. Hol (2012). "GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease." PLoS One **7**(8): e42823.

- Kerr, J. S., B. A. Adriaanse, N. H. Greig, M. P. Mattson, M. Z. Cader, V. A. Bohr and E. F. Fang (2017). "Mitophagy and Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Mechanisms." *Trends Neurosci* **40**(3): 151-166.
- Kim, Y. M., C. H. Jung, M. Seo, E. K. Kim, J. M. Park, S. S. Bae and D. H. Kim (2015). "mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation." *Mol Cell* **57**(2): 207-218.
- Kepp, K. P., N. K. Robakis, P. F. Hoilund-Carlsen, S. L. Sensi and B. Vissel (2023). "The amyloid cascade hypothesis: an updated critical review." *Brain* **146**(10): 3969-3990.
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen and others (2016). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)." *Autophagy* **12**(1): 1-222.
- Knopman, D. S., H. Amieva, R. C. Petersen, G. Chetelat, D. M. Holtzman, B. T. Hyman, R. A. Nixon and D. T. Jones (2021). "Alzheimer disease." *Nat Rev Dis Primers* **7**(1): 33.
- Kulkarni, A. S., S. Gubbi and N. Barzilai (2020). "Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging." *Cell Metab* **32**(1): 15-30.
- Lacovich, V., S. L. Espindola, M. Alloatti, V. Pozo Devoto, L. E. Cromberg, M. E. Carna, G. Forte, J. M. Gallo, L. Bruno, G. B. Stokin, M. E. Avale and T. L. Falzone (2017). "Tau Isoforms Imbalance Impairs the Axonal Transport of the Amyloid Precursor Protein in Human Neurons." *J Neurosci* **37**(1): 58-69.
- Lahiri, V., W. D. Hawkins and D. J. Klionsky (2019). "Watch What You (Self-) Eat: Autophagic Mechanisms that Modulate Metabolism." *Cell Metab* **29**(4): 803-826.
- Lamming, D. W. and L. Bar-Peled (2019). "Lysosome: The metabolic signaling hub." *Traffic* **20**(1): 27-38.
- Lisman, J., G. Buzsaki, H. Eichenbaum, L. Nadel, C. Ranganath and A. D. Redish (2017). "Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition." *Nat Neurosci* **20**(11): 1434-1447.
- Merighi, S., M. Nigro, A. Travagli and S. Gessi (2022). "Microglia and Alzheimer's Disease." *Int J Mol Sci* **23**(21).
- Mitchell, J. P. and R. J. Carmody (2018). "NF-kappaB and the Transcriptional Control of Inflammation." *Int Rev Cell Mol Biol* **335**: 41-84.
- Morita, M., S. P. Gravel, V. Chenard, K. Sikstrom, L. Zheng, T. Alain, V. Gandin, D. Avizonis, M. Arguello, C. Zakaria, S. McLaughlan, Y. Nouet, A. Pause, M. Pollak, E. Gottlieb, O. Larsson, J. St-Pierre, I. Topisirovic and N. Sonnenberg (2013). "mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation." *Cell Metab* **18**(5): 698-711.
- Mucke, L., E. Masliah, G. Q. Yu, M. Mallory, E. M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, K. Johnson-Wood and L. McConlogue (2000). "High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid precursor protein transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation." *J Neurosci* **20**(11): 4050-4058.

- Mudgal, J., M. Nampoothiri, S. Basu Mallik, M. Kinra, S. Hall, G. Grant, S. Anoopkumar-Dukie, C. M. Rao and D. Arora (2019). "Possible involvement of metformin in downregulation of neuroinflammation and associated behavioural changes in mice." *Inflammopharmacology* **27**(5): 941-948.
- Mufson, E. J., L. Mahady, D. Waters, S. E. Counts, S. E. Perez, S. T. DeKosky, S. D. Ginsberg, M. D. Ikonomovic, S. W. Scheff and L. I. Binder (2015). "Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease." *Neuroscience* **309**: 51-67.
- Neha, R. K. Sodhi, A. S. Jaggi and N. Singh (2014). "Animal models of dementia and cognitive dysfunction." *Life Sci* **109**(2): 73-86.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff and F. Helmchen (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." *Science* **308**(5726): 1314-1318.
- Nixon, R. A. and D. S. Yang (2011). "Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect." *Neurobiol Dis* **43**(1): 38-45.
- Oakley, H., S. L. Cole, S. Logan, E. Maus, P. Shao, J. Craft, A. Guillozet-Bongaarts, M. Ohno, J. Disterhoft, L. Van Eldik, R. Berry and R. Vassar (2006). "Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation." *J Neurosci* **26**(40): 10129-10140.
- Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kayed, R. Metharate, M. P. Mattson, Y. Akbari and F. M. LaFerla (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." *Neuron* **39**(3): 409-421.
- Oliveira, W. H., A. K. Nunes, M. E. Franca, L. A. Santos, D. B. Los, S. W. Rocha, K. P. Barbosa, G. B. Rodrigues and C. A. Peixoto (2016). "Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice." *Brain Res* **1644**: 149-160.
- Ou, Z., X. Kong, X. Sun, X. He, L. Zhang, Z. Gong, J. Huang, B. Xu, D. Long, J. Li, Q. Li, L. Xu and A. Xuan (2018). "Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice." *Brain Behav Immun* **69**: 351-363.
- Ozben, T. and S. Ozben (2019). "Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease." *Clin Biochem* **72**: 87-89.
- Paolicelli, R. C., G. Bolasco, F. Pagani, L. Maggi, M. Scianni, P. Panzanelli, M. Giustetto, T. A. Ferreira, E. Guiducci, L. Dumas, D. Ragozzino and C. T. Gross (2011). "Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development." *Science* **333**(6048): 1456-1458.
- Park, J. M., C. H. Jung, M. Seo, N. M. Otto, D. Grunwald, K. H. Kim, B. Moriarity, Y. M. Kim, C. Starker, R. S. Nho, D. Voytas and D. H. Kim (2016). "The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14." *Autophagy* **12**(3): 547-564.
- Parkhurst, C. N., G. Yang, I. Ninan, J. N. Savas, J. R. Yates, 3rd, J. J. Lafaille, B. L. Hempstead, D. R. Littman and W. B. Gan (2013). "Microglia promote

learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor." *Cell* **155**(7): 1596-1609.

Pathak, C. and U. D. Kabra (2024). "A comprehensive review of multi-target directed ligands in the treatment of Alzheimer's disease." *Bioorg Chem* **144**: 107152.

Pickford, F., E. Masliah, M. Britschgi, K. Lucin, R. Narasimhan, P. A. Jaeger, S. Small, B. Spencer, E. Rockenstein, B. Levine and T. Wyss-Coray (2008). "The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice." *J Clin Invest* **118**(6): 2190-2199.

Picone, P., D. Nuzzo, L. Caruana, E. Messina, A. Barera, S. Vasto and M. Di Carlo (2015). "Metformin increases APP expression and processing via oxidative stress, mitochondrial dysfunction and NF- κ B activation: Use of insulin to attenuate metformin's effect." *Biochim Biophys Acta* **1853**(5): 1046-1059.

Picone, P., S. Vilasi, F. Librizzi, M. Contardi, D. Nuzzo, L. Caruana, S. Baldassano, A. Amato, F. Mule, P. L. San Biagio, D. Giacomazza and M. Di Carlo (2016). "Biological and biophysics aspects of metformin-induced effects: cortex mitochondrial dysfunction and promotion of toxic amyloid pre-fibrillar aggregates." *Aging (Albany NY)* **8**(8): 1718-1734.

Pilipenko, V., K. Narbute, J. Pupure, I. K. Langrate, R. Muceniece and V. Klusa (2020). "Neuroprotective potential of antihyperglycemic drug metformin in streptozocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease." *Eur J Pharmacol* **881**: 173290.

Plaza-Zabala, A., V. Sierra-Torre and A. Sierra (2017). "Autophagy and Microglia: Novel Partners in Neurodegeneration and Aging." *Int J Mol Sci* **18**(3).

Pomilio, C., R. M. Gorjod, M. Riudavets, A. Vinuesa, J. Presa, A. Gregosa, M. Bentivegna, A. Alaimo, S. P. Alcon, G. Sevlever, M. L. Kotler, J. Beauquis and F. Saravia (2020). "Microglial autophagy is impaired by prolonged exposure to beta-amyloid peptides: evidence from experimental models and Alzheimer's disease patients." *Geroscience* **42**(2): 613-632.

Pomilio, C., P. Pavia, R. M. Gorjod, A. Vinuesa, A. Alaimo, V. Galvan, M. L. Kotler, J. Beauquis and F. Saravia (2016). "Glial alterations from early to late stages in a model of Alzheimer's disease: Evidence of autophagy involvement in Abeta internalization." *Hippocampus* **26**(2): 194-210.

Pomilio, C., N. G. Perez, I. Calandri, L. Crivelli, R. Allegri, A. A. s. D. N. Initiative, G. Sevlever and F. Saravia (2022). "Diabetic patients treated with metformin during early stages of Alzheimer's disease show a better integral performance: data from ADNI study." *Geroscience* **44**(3): 1791-1805.

Rotermund, C., G. Machetanz and J. C. Fitzgerald (2018). "The Therapeutic Potential of Metformin in Neurodegenerative Diseases." *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**: 400.

Saffari, P. M., S. Alijanpour, N. Takzaree, M. Sahebgharani, S. Etemad-Moghadam, F. Noorbakhsh and A. Partoazar (2020). "Metformin loaded phosphatidylserine nanoliposomes improve memory deficit and reduce neuroinflammation in streptozotocin-induced Alzheimer's disease model." *Life Sci* **255**: 117861.

- Samaras, K., S. Makkar, J. D. Crawford, N. A. Kochan, W. Wen, B. Draper, J. N. Trollor, H. Brodaty and P. S. Sachdev (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**(11): 2691-2701.
- Satoh, J., Y. Kino, N. Asahina, M. Takitani, J. Miyoshi, T. Ishida and Y. Saito (2016). "Tmem19 marks a subset of microglia in the human brain." *Neuropathology* **36**(1): 39-49.
- Saunders, A. M., W. J. Strittmatter, D. Schmechel, P. H. George-Hyslop, M. A. Pericak-Vance, S. H. Joo, B. L. Rosi, J. F. Gusella, D. R. Crapper-MacLachlan, M. J. Alberts and et al. (1993). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." *Neurology* **43**(8): 1467-1472.
- Savelieff, M. G., G. Nam, J. Kang, H. J. Lee, M. Lee and M. H. Lim (2019). "Development of Multifunctional Molecules as Potential Therapeutic Candidates for Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Last Decade." *Chem Rev* **119**(2): 1221-1322.
- Schmitz, K., J. Cox, L. M. Esser, M. Voss, K. Sander, A. Loffler, F. Hillebrand, S. Erkelenz, H. Schaal, T. Kahne, S. Klinker, T. Zhang, L. Nagel-Steger, D. Willbold, S. Seggewiss, D. Schlutermann, B. Stork, M. Grimmer, S. Wesselborg and C. Peter (2021). "An essential role of the autophagy activating kinase ULK1 in snRNP biogenesis." *Nucleic Acids Res* **49**(11): 6437-6455.
- Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The inflammasomes." *Cell* **140**(6): 821-832.
- Silvers, R., M. T. Colvin, K. K. Frederick, A. C. Jacavone, S. Lindquist, S. Linse and R. G. Griffin (2017). "Aggregation and Fibril Structure of Abeta(M01-42) and Abeta(1-42)." *Biochemistry* **56**(36): 4850-4859.
- Simanaviciute, U., R. E. Brown, A. Wong, E. Fertan and R. A. Grant (2022). "Abnormal whisker movements in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease." *Genes Brain Behav* **21**(8): e12813.
- Simon, A. M., L. Schiapparelli, P. Salazar-Colcho, M. Cuadrado-Tejedor, L. Escribano, R. Lopez de Maturana, J. Del Rio, A. Perez-Mediavilla and D. Frechilla (2009). "Overexpression of wild-type human APP in mice causes cognitive deficits and pathological features unrelated to Abeta levels." *Neurobiol Dis* **33**(3): 369-378.
- Sperling, R. A., P. S. Aisen, L. A. Beckett, D. A. Bennett, S. Craft, A. M. Fagan, T. Iwatsubo, C. R. Jack, Jr., J. Kaye, T. J. Montine, D. C. Park, E. M. Reiman, C. C. Rowe, E. Siemers, Y. Stern, K. Yaffe, M. C. Carrillo, B. Thies, M. Morrison-Bogorad, M. V. Wagster and C. H. Phelps (2011). "Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* **7**(3): 280-292.
- Stavoe, A. K. H. and E. L. F. Holzbaur (2019). "Autophagy in Neurons." *Annu Rev Cell Dev Biol* **35**: 477-500.
- Stephenné, X., M. Foretz, N. Taleux, G. C. van der Zon, E. Sokal, L. Hue, B. Viollet and B. Guigas (2011). "Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary

- human hepatocytes by decreasing cellular energy status." *Diabetologia* **54**(12): 3101-3110.
- Sterniczuk, R., M. C. Antle, F. M. Laferla and R. H. Dyck (2010). "Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes." *Brain Res* **1348**: 149-155.
- Streit, W. J., R. E. Mrak and W. S. Griffin (2004). "Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective." *J Neuroinflammation* **1**(1): 14.
- Sun, Y. X., X. Ji, X. Mao, L. Xie, J. Jia, V. Galvan, D. A. Greenberg and K. Jin (2014). "Differential activation of mTOR complex 1 signaling in human brain with mild to severe Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **38**(2): 437-444.
- Takahama, M., S. Akira and T. Saitoh (2018). "Autophagy limits activation of the inflammasomes." *Immunol Rev* **281**(1): 62-73.
- Tampi, R. R., B. P. Forester and M. Agronin (2021). "Aducanumab: evidence from clinical trial data and controversies." *Drugs Context* **10**.
- Tao, L., D. Li, H. Liu, F. Jiang, Y. Xu, Y. Cao, R. Gao and G. Chen (2018). "Neuroprotective effects of metformin on traumatic brain injury in rats associated with NF-kappaB and MAPK signaling pathway." *Brain Res Bull* **140**: 154-161.
- Tayara, K., A. M. Espinosa-Oliva, I. Garcia-Dominguez, A. A. Ismaiel, A. Boza-Serrano, T. Deierborg, A. Machado, A. J. Herrera, J. L. Venero and R. M. de Pablos (2018). "Divergent Effects of Metformin on an Inflammatory Model of Parkinson's Disease." *Front Cell Neurosci* **12**: 440.
- Thinakaran, G. and E. H. Koo (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." *J Biol Chem* **283**(44): 29615-29619.
- Tonries, E. and E. Trushina (2017). "Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease." *J Alzheimers Dis* **57**(4): 1105-1121.
- Ueda, K., Y. Fukui and H. Kageyama (1994). "Amyloid beta protein-induced neuronal cell death: neurotoxic properties of aggregated amyloid beta protein." *Brain Res* **639**(2): 240-244.
- Vaillancourt, D. E. (2016). "Aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease." *Mov Disord* **31**(11): 1631.
- van Dyck, C. H., C. J. Swanson, P. Aisen, R. J. Bateman, C. Chen, M. Gee, M. Kanekiyo, D. Li, L. Reyderman, S. Cohen, L. Froelich, S. Katayama, M. Sabbagh, B. Vellas, D. Watson, S. Dhadda, M. Irizarry, L. D. Kramer and T. Iwatsubo (2023). "Lecanemab in Early Alzheimer's Disease." *N Engl J Med* **388**(1): 9-21.
- Wang, Y., H. An, T. Liu, C. Qin, H. Sesaki, S. Guo, S. Radovick, M. Hussain, A. Maheshwari, F. E. Wondisford, B. O'Rourke and L. He (2019). "Metformin Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK." *Cell Rep* **29**(6): 1511-1523 e1515.
- Wang, Y., M. Martinez-Vicente, U. Kruger, S. Kaushik, E. Wong, E. M. Mandelkow, A. M. Cuervo and E. Mandelkow (2009). "Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing." *Hum Mol Genet* **18**(21): 4153-4170.

- West, M. J. (1993). "Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus." *Neurobiol Aging* **14**(4): 287-293.
- Wolf, S. A., H. W. Boddeke and H. Kettenmann (2017). "Microglia in Physiology and Disease." *Annu Rev Physiol* **79**: 619-643.
- Wu, Y. T., A. S. Beiser, M. M. B. Breteler, L. Fratiglioni, C. Helmer, H. C. Hendrie, H. Honda, M. A. Ikram, K. M. Langa, A. Lobo, F. E. Matthews, T. Ohara, K. Peres, C. Qiu, S. Seshadri, B. M. Sjolund, I. Skoog and C. Brayne (2017). "The changing prevalence and incidence of dementia over time - current evidence." *Nat Rev Neurosci* **13**(6): 327-339.
- Yokoyama, M., H. Kobayashi, L. Tatsumi and T. Tomita (2022). "Mouse Models of Alzheimer's Disease." *Front Mol Neurosci* **15**: 912995.
- Zeng, Q., W. Siu, L. Li, Y. Jin, S. Liang, M. Cao, M. Ma and Z. Wu (2019). "Autophagy in Alzheimer's disease and promising modulatory effects of herbal medicine." *Exp Gerontol* **119**: 100-110.
- Zhang, H., J. T. Chang, B. Guo, M. Hansen, K. Jia, A. L. Kovacs, C. Kumsta, L. R. Lapierre, R. Legouis, L. Lin, Q. Lu, A. Melendez, E. J. O'Rourke, K. Sato, M. Sato, X. Wang and F. Wu (2015). "Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans*." *Autophagy* **11**(1): 9-27.
- Zhao, C., W. Deng and F. H. Gage (2008). "Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis." *Cell* **132**(4): 645-660.
- Zhao, Y. and B. Zhao (2013). "Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Oxid Med Cell Longev* **2013**: 316523.
- Zhao, Z., A. P. Sagare, Q. Ma, M. R. Halliday, P. Kong, K. Kisler, E. A. Winkler, A. Ramanathan, T. Kanekiyo, G. Bu, N. C. Owens, S. V. Rege, G. Si, A. Ahuja, D. Zhu, C. A. Miller, J. A. Schneider, M. Maeda, T. Maeda, T. Sugawara, J. K. Ichida and B. V. Zlokovic (2015). "Central role for PICALM in amyloid-beta blood-brain barrier transcytosis and clearance." *Nat Neurosci* **18**(7): 978-987.
- Zheng, J., M. Xu, V. Walker, J. Yuan, R. Korologou-Linden, J. Robinson, P. Huang, S. Burgess, S. L. Au Yeung, S. Luo, M. V. Holmes, G. Davey Smith, G. Ning, W. Wang, T. R. Gaunt and Y. Bi (2022). "Evaluating the efficacy and mechanism of metformin targets on reducing Alzheimer's disease risk in the general population: a Mendelian randomisation study." *Diabetologia* **65**(10): 1664-1675.
- Zhou, G., R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear and D. E. Moller (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." *J Clin Invest* **108**(8): 1167-1174.
- Zhou, J., S. H. Tan, V. Nicolas, C. Bauvy, N. D. Yang, J. Zhang, Y. Xue, P. Codogno and H. M. Shen (2013). "Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion." *Cell Res* **23**(4): 508-523.