

INSULINA INTRANASALE PER LA MALATTIA DI ALZHEIMER

A cura della Dott.ssa Antonia Manti

INTRODUZIONE

La malattia di Alzheimer (AD), è caratterizzata dalla presenza di placche di beta amiloide (A β), ammassi neurofibrillari, perdita neuronale corticale diffusa e deterioramento cognitivo (1-3). La resistenza centrale all'insulina sembra giocare un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella progressione della malattia (4,5). Diversi studi hanno rivelato una riduzione della sensibilità del recettore dell'insulina cerebrale e dell'espressione del recettore insulinico nei cervelli *post mortem* in soggetti affetti da AD (6-8). Inoltre, il diabete, una patologia strettamente legata all'insulino-resistenza, è stato identificato come un fattore di rischio significativo per lo sviluppo di AD. A tal proposito, una recente meta-analisi di studi longitudinali che hanno coinvolto 1.746.777 individui ha rivelato che il rischio di AD è aumentato di circa il 50% nei diabetici rispetto alla popolazione generale (9). Alla luce di queste evidenze, gli studi clinici in corso che si occupano della AD utilizzano principalmente terapie progettate per ridurre l'insulino-resistenza nel cervello (10,11). In questo contesto, grandi speranze sono state associate alla somministrazione di insulina per via intranasale per aumentare i livelli di insulina nel sistema nervoso centrale (CNS).

MECCANISMO D'AZIONE

Studi condotti su animali hanno dimostrato che l'insulina può essere trasportata, senza compromettere le sue proprietà biologiche, lungo le vie olfattiva e trigeminale al cervello attraverso la via nasale (12-21). Il nervo olfattivo termina nel bulbo olfattivo mentre il nervo trigemino entra nel cervello attraversando la lamina cribrosa, consentendo il rilascio di farmaci sia nella regione anteriore che posteriore del cervello (18,20). Si ritiene che il trasporto di sostanze lungo le vie olfattive e del trigemino avvenga attraverso meccanismi sia intracellulari che extracellulari (22). La somministrazione intranasale sembra aumentare i livelli di insulina cerebrale negli esseri umani, così come avviene negli animali (23,24). In uno studio condotto da Born et al. nel 2002 (25) su 36 pazienti sani (9 femmine, 27 maschi, 25-41 anni di età), le concentrazioni di insulina nel liquido cerebrospinale (CSF) e nel siero sono state misurate dinamicamente entro 80 minuti dalla somministrazione intranasale (40 unità internazionali (UI) di insulina umana regolare) in campioni di CSF e sangue venoso. Le concentrazioni di insulina nel CSF hanno cominciato ad aumentare entro 10 minuti dalla somministrazione e hanno raggiunto il picco dopo 30 minuti; tuttavia, le concentrazioni sieriche sono rimaste inalterate (25). È interessante notare che ci sono diversi studi in cui la somministrazione in acuto di insulina intranasale ha portato ad un aumento transitorio dell'insulina sierica ed a una riduzione del glucosio

plasmatico (26-29). Tuttavia, questi aumenti di breve durata dell'insulina sierica, dovuta alla somministrazione intranasale di insulina, sono sostanzialmente meno problematici degli aumenti più grandi e più sostenuti risultanti dalla somministrazione periferica. Diversi studi supportano l'ipotesi che l'insulina intranasale raggiunga livelli fisiologicamente rilevanti nel cervello dell'uomo. Per esempio, una singola dose intranasale di 60 UI ha cambiato in modo significativo l'attività cerebrale 30 minuti dopo la somministrazione in uomini sani (30). Di contro, l'insulina intranasale aumenta la connettività funzionale a riposo tra l'ippocampo e altre regioni cerebrali, il che può spiegare alcuni dei suoi benefici a livello cognitivo (31,32). Infine, in linea con gli studi fatti sui topi, l'insulina cerebrale è anoressigena e regola il metabolismo energetico di tutto il corpo (33, 34), l'insulina intranasale riduce il grasso corporeo, altera a livello del CNS gli stimoli alimentari con conseguente riduzione di assunzione di cibo e migliora la sensibilità dell'insulina a livello periferico (35-41). Sebbene queste osservazioni non siano direttamente correlate all'AD, indicano che l'insulina intranasale raggiunge effettivamente il CNS e lo fa a concentrazioni terapeuticamente utili.

STUDI PRECLINICI

Diversi studi, che hanno coinvolto sia modelli cognitivamente sani che animali con AD, hanno studiato gli effetti dell'insulina intranasale. Per quanto riguarda le funzioni cognitive, la stragrande maggioranza degli studi sugli animali ha prodotto risultati incoraggianti, in particolare si è notato che sia il trattamento con insulina intranasale acuto che quello cronico, migliora le funzioni cognitive. Nello specifico, sono stati rivelati significativi miglioramenti nella memoria spaziale, nel processo decisionale, nella memoria motoria e nel riconoscimento di nuovi oggetti. Studi su topi wild type e 3xTg-AD - un modello transgenico di AD - hanno dimostrato che l'insulina intranasale per ≥ 1 mese ha migliorato le funzioni di memoria spaziale (42,43). Simili effetti di miglioramento sulla memoria spaziale si sono avuti dopo somministrazione intranasale acuta di insulina in un altro modello di AD (i topi SAMP8) (44). È interessante notare come la somministrazione di insulina dopo 5 minuti potenzia la memoria spaziale nei topi SAMP8, ma non se l'insulina viene somministrata 24 ore dopo la fase di training prima del test (45). Ciò indica che la tempistica della somministrazione di insulina intranasale è molto importante per gli effetti sul miglioramento della memoria. Vi sono, tuttavia, una minoranza di studi che non supportano i risultati di miglioramento cognitivo. Ad esempio, lo studio condotto da Bell e Fadool nel 2017 che ha valutato l'effetto sulla memoria dell'insulina intranasale somministrata giornalmente per due mesi, non ha riportato alcun effetto significativo (46). I risultati sopra menzionati, con qualche eccezione, indicano l'insulina intranasale utile per il trattamento dei deficit cognitivi in pazienti affetti da AD. Sono necessari, tuttavia, ulteriori studi che indaghino se l'insulina intranasale alteri il turnover dei metaboliti del cervello che sono coinvolti nell'eziologia dell'AD.

STUDI CLINICI SU SOGGETTI COGNITIVAMENTE SANI

Studi condotti su soggetti cognitivamente sani hanno permesso di comprendere gli effetti della somministrazione di insulina intranasale a lungo termine sulla cognizione. Il primo studio randomizzato controllato ha coinvolto giovani adulti normopeso o obesi (<40 anni), che sono stati trattati per 8 settimane con dosi giornaliere di insulina intranasale regolare osservando un miglioramento della memoria (49,50). Questo effetto a lungo termine era ancora più evidente quando veniva erogata per via nasale per 8 settimane, l'insulina aspart, un analogo dell'insulina ad azione rapida (51). Studi più recenti hanno ottenuto risultati che suggeriscono che una singola dose di insulina intranasale è già sufficiente per migliorare le prestazioni cognitive negli esseri umani cognitivamente sani (52-54). Uno studio condotto da Reger et al. nel 2008 ha dimostrato come 10 e 20 UI di insulina siano efficaci nel ridurre le concentrazioni plasmatiche dei livelli di peptide beta amiloide anomalo (A β 42), più elevate nei soggetti a rischio di AD, in soggetti anziani cognitivamente sani (età media > 70 anni) (55). Per riassumere, i risultati in pazienti cognitivamente sani sono incoraggianti in quanto suggeriscono che l'insulina intranasale può, in un modo dipendente dalla dose, migliorare le funzioni cognitive. Va notato tuttavia che alcuni studi riportano risultati nulli. Ad esempio, uno studio condotto in soggetti cognitivamente sani di età > 70 anni usati come controlli per i pazienti con lieve deterioramento cognitivo (MCI) e AD, una singola dose di insulina intranasale (compresa tra 10 e 60 UI) non ha migliorato l'attenzione e la memoria (55,57). Inoltre, un recente studio condotto su giovani adulti (<30 anni) ha scoperto che l'insulina intranasale, somministrata prima del sonno, compromette l'acquisizione di nuovi contenuti sia nei sistemi di memoria dichiarativi che procedurali il giorno successivo (58). Questo studio suggerisce che l'insulina intranasale altera le funzioni di memoria negli esseri umani e può essere soggetta a regolazione circadiana. Infine, la stragrande maggioranza degli studi che si sono occupati degli effetti dell'insulina intranasale sulla memoria in esseri umani cognitivamente sani non riporta effetti avversi, ad eccezione di alcuni casi di calo transitorio del glucosio plasmatico (59) e di aumento acuto della pressione sanguigna (60). A prima vista, questo indica un profilo di effetti collaterali favorevole dell'insulina intranasale negli esseri umani, almeno nel lungo periodo. D'altra parte, è necessaria cautela, in quanto non si può escludere che questi studi non abbiano monitorato attentamente i possibili effetti collaterali durante e dopo la cessazione della somministrazione dell'insulina intranasale.

STUDI CONDOTTI SU SOGGETTI CON AD

L'ultimo decennio ha visto un'impennata negli studi clinici per l'insulina intranasale in pazienti con MCI e AD. Gli studi dimostrano che la somministrazione sia acuta che cronica di varie formulazioni di insulina migliora

le funzioni cognitive (55,57,61-65) quali la memoria verbale e l'attenzione. Inoltre, i pazienti con deficit cognitivo trattati con insulina intranasale mostrano segni di miglioramento funzionale (61,62). È importante evidenziare che mentre la sfera cognitiva dei pazienti Apolipoproteina E4 (APOE4) negativi trattati con insulina nasale migliorava (55,57,62), in pazienti positivi all'APOE4, sono stati ottenuti risultati misti. Ad esempio, è stato visto che mentre la somministrazione intranasale di insulina regolare non ha alterato o addirittura compromesso le funzioni cognitive (66), tre settimane di somministrazioni giornaliere di insulina intranasale hanno determinato miglioramento delle funzioni cognitive nei pazienti positivi all'APOE4 (63,66). Il quadro risulta ancora maggiormente complesso se si considera che le donne e gli uomini APOE4-negativi presentano differenti modelli dose-risposta. Infatti nello studio condotto da Claxton nel 2013 le funzioni cognitive risultavano generalmente migliorate nei due gruppi di maschi trattati giornalmente per 4 mesi con insulina regolare intranasale alla dose di 20 e 40 UI rispettivamente. Al contrario, le prestazioni cognitive delle donne APOE4 negative erano diminuite nel tempo nel gruppo trattato con la dose di 40UI ma non in quelle trattate con 20 UI (64). La base meccanicistica di questa differenza tra uomini e donne correlata all'APOE rimane sconosciuta. Nel più grande studio condotto fino ad oggi (Craft et al, 2012) (62) che ha coinvolto 104 pazienti con compromissione cognitiva con MCI o AD in cui i soggetti sono stati assegnati a tre bracci di studio e sono stati somministrati ogni giorno rispettivamente 20 UI di insulina, 40 UI di insulina e placebo per 4 mesi, la terapia insulinica intranasale ha migliorato la memoria ritardata (nel gruppo di 20 UI) e ha conservato l'abilità funzionale (entrambi i gruppi). Questi risultati sono stati successivamente confermati in uno studio più piccolo che ha dimostrato come la somministrazione intranasale di insulina regolare (40 UI al giorno per quattro mesi) migliori la memoria e conservi il volume cerebrale (63). Studi condotti su pazienti con MCI e AD hanno dimostrato che l'insulina intranasale non altera solo le funzioni cognitive, ma anche i livelli dei biomarkers AD sia nella circolazione che nel CSF. Ad esempio, i pazienti con compromissione cognitiva trattati con 20 UI di insulina regolare (due volte al giorno) per 21 giorni hanno mostrato un aumento del rapporto A β 40/42 nel sangue, sia in condizioni di digiuno che post-prandiale (61). Il rapporto aumentato potrebbe indicare che è stato prodotto meno A β 42 nel cervello (e/o periferia). In alternativa, un'altra spiegazione potrebbe essere che meno A β 42 ha raggiunto la circolazione a causa dell'aumentata deposizione nel cervello. In uno studio clinico condotto da Reger nel 2008 ha testato gli effetti acuti di quattro dosi intranasali di insulina regolare (10, 20, 40 o 60 UI), dosi più elevate sono state associate ad aumentate concentrazioni plasmatiche di A β 42 in pazienti negativi all'APOE4 (55).

CONCLUSIONI

La somministrazione intranasale di insulina sembra fornire vantaggi terapeutici per il trattamento di AD, ma d'altronde, fino ad oggi, gli effetti dell'insulina intranasale sono stati studiati solo in campioni relativamente piccoli (bracci di trattamento con meno di 50 pazienti) per non più di 4 mesi. Inoltre, il genere, il genotipo e il tipo di formulazione di insulina sembrano modificare considerevolmente la risposta del paziente. Alla luce di questi dati, sono necessari ulteriori studi di maggiore durata e che coinvolgano popolazioni di campioni più ampi e specifici per fornire un'immagine più chiara della connessione tra insulina e patologia AD.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81 (2), 741e766;
- 2) Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297 (5580), 353e356;
- 3) Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.X., 2016. Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat. Rev. Neurol.* 12 (1), 15e27;
- 4) Ma, Q.L., Yang, F., Rosario, E.R., Ubeda, O.J., Beech, W., Gant, D.J., Chen, P.P., Hudspeth, B., Chen, C., Zhao, Y., Vinters, H.V., Frautschy, S.A., Cole, G.M., 2009. Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J. Neurosci.* 29 (28), 9078e9089;
- 5) De Felice, F.G., Vieira, M.N., Bomfim, T.R., Decker, H., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K.L., Zhao, W.Q., Ferreira, S.T., Klein, W.L., 2009. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (6), 1971e1976;
- 6) Steen, E., Terry, B.M., Rivera, E.J., Cannon, J.L., Neely, T.R., Tavares, R., Xu, X.J., Wands, J.R., de la Monte, S.M., 2005. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers Dis.* 7 (1), 63e80;
- 7) Moloney, A.M., Griffin, R.J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., O'Neill, C., 2010. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol. Aging* 31 (2), 224e243;
- 8) Talbot, K., Wang, H.Y., Kazi, H., Han, L.Y., Bakshi, K.P., Stucky, A., Fuino, R.L., Kawaguchi, K.R., Samoyedny, A.J., Wilson, R.S., Arvanitakis, Z., Schneider, J.A., Wolf, B.A., Bennett, D.A., Trojanowski, J.Q., Arnold, S.E., 2012. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 122 (4), 1316e1338;
- 9) Zhang, J., Chen, C., Hua, S., Liao, H., Wang, M., Xiong, Y., Cao, F., 2017. An updated meta-analysis of cohort studies: diabetes and risk of Alzheimer's disease. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 124, 41e47;
- 10) Bomfim, T.R., Forny-Germano, L., Sathler, L.B., Brito-Moreira, J., Houzel, J.C., Decker, H., Silverman, M.A., Kazi, H., Melo, H.M., McClean, P.L., Holscher, C., Arnold, S.E., Talbot, K., Klein, W.L., Munoz, D.P., Ferreira, S.T., De Felice, F.G., 2012. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated Ab oligomers. *J. Clin. Invest.* 122 (4), 1339e1353;
- 11) Talbot, K., Wang, H.Y., 2014. The nature, significance, and glucagon-like peptide-1 analog treatment of brain insulin resistance in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 10 (1 Suppl), S12eS25;
- 12) Thorne, R.G., Emory, C.R., Ala, T.A., Frey 2nd, W.H., 1995. Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res.* 692 (1e2), 278e282;
- 13) Thorne, R.G., Pronk, G.J., Padmanabhan, V., Frey 2nd, W.H., 2004. Delivery of insulinlike growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience* 127 (2), 481e496;
- 14) Thorne, R.G., Hanson, L.R., Ross, T.M., Tung, D., Frey 2nd, W.H., 2008. Delivery of interferon-beta to the monkey nervous system following intranasal administration. *Neuroscience* 152 (3), 785e797;
- 15) Liu, X.F., Fawcett, J.R., Thorne, R.G., DeFor, T.A., Frey 2nd, W.H., 2001. Intranasal administration of insulin-like growth factor-I bypasses the blood-brain barrier and protects against focal cerebral ischemic damage. *J. Neurol. Sci.* 187 (1e2), 91e97;
- 16) Ross, T.M., Martinez, P.M., Renner, J.C., Thorne, R.G., Hanson, L.R., Frey 2nd, W.H., 2004. Intranasal administration of interferon beta bypasses the blood-brain barrier to target the central nervous system and cervical lymph nodes: a non-invasive treatment strategy for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 151 (1e2), 66e77;

- 17) Ma, Y.P., Ma, M.M., Ge, S., Guo, R.B., Zhang, H.J., Frey 2nd, W.H., Xu, G.L., Liu, X.F., 2007. Intranasally delivered TGF-beta1 enters brain and regulates gene expressions of its receptors in rats. *Brain Res. Bull.* 74 (4), 271e277;
- 18) Lochhead, J.J., Thorne, R.G., 2012. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (7), 614e628;
- 19) Renner, D.B., Frey 2nd, W.H., Hanson, L.R., 2012a. Intranasal delivery of siRNA to the olfactory bulbs of mice via the olfactory nerve pathway. *Neurosci. Lett.* 513 (2), 193e197;
- 20) Renner, D.B., Svitak, A.L., Gallus, N.J., Ericson, M.E., Frey 2nd, W.H., Hanson, L.R., 2012b. Intranasal delivery of insulin via the olfactory nerve pathway. *J. Pharm. Pharmacol.* 64 (12), 1709e1714;
- 21) Dhuria, S.V., Fine, J.M., Bingham, D., Svitak, A.L., Burns, R.B., Baillargeon, A.M., Panter, S.S., Kazi, A.N., Frey 2nd, W.H., Hanson, L.R., 2016. Food consumption and activity levels increase in rats following intranasal Hypocretin-1. *Neurosci. Lett.* 627, 155e159;
- 22) Chapman, C.D., Frey 2nd, W.H., Craft, S., Danielyan, L., Hallschmid, M., Schi€oth, H.B., Benedict, C., 2013. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm. Res.* 30 (10), 2475e2484;
- 23) Salameh, T.S., Bullock, K.M., Hujoel, I.A., Niehoff, M.L., Wolden-Hanson, T., Kim, J., Morley, J.E., Farr, S.A., Banks, W.A., 2015. Central nervous system delivery of intranasal insulin: mechanisms of uptake and effects on cognition. *J. Alzheimers Dis.* 47 (3), 715e728;
- 24) Ramos-Rodriguez, J.J., Sanchez-Sotano, D., Doblas-Marquez, A., Infante-Garcia, C., Lubian-Lopez, S., Garcia-Alloza, M., 2017. Intranasal insulin reverts central pathology and cognitive impairment in diabetic mother offspring. *Mol. Neurodegener.* 12: 57;
- 25) Born, J., Lange, T., Kern, W., McGregor, G.P., Bickel, U., Fehm, H.L., 2002. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat. Neurosci.* 5 (6), 514e516;
- 26) Benedict, C., Brede, S., Schi€oth, H.B., Lehnert, H., Schultes, B., Born, J., Hallschmid, M., 2011. Intranasal insulin enhances postprandial thermogenesis and lowers postprandial serum insulin levels in healthy men. *Diabetes* 60 (1), 114e118;
- 27) Heni, M., Kullmann, S., Ketterer, C., Guthoff, M., Linder, K., Wagner, R., Stingl, K.T., Veit, R., Staiger, H., H€aring, H.U., Preissl, H., Fritsche, A., 2012. Nasal insulin changes peripheral insulin sensitivity simultaneously with altered activity in homeostatic and reward-related human brain regions. *Diabetologia* 55 (6), 1773e1782;
- 28) Br€unner, Y.F., Benedict, C., Freiherr, J., 2013. Intranasal insulin reduces olfactory sensitivity in normosmic humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 (10), E1626eE1630;
- 29) Thienel, M., Wilhelm, I., Benedict, C., Born, J., Hallschmid, M., 2017. Intranasal insulin decreases circulating cortisol concentrations during early sleep in elderly humans. *Neurobiol. Aging* 54, 170e174;
- 30) Hallschmid, M., Schultes, B., Marshall, L., M€olle, M., Kern, W., Bredthauer, J., Fehm, H.L., Born, J., 2004a. Transcortical direct current potential shift reflects immediate signaling of systemic insulin to the human brain. *Diabetes* 53 (9), 2202e2208;
- 31) Zhang, H., Hao, Y., Manor, B., Novak, P., Milberg, W., Zhang, J., Fang, J., Novak, V., 2015. Intranasal insulin enhanced resting-state functional connectivity of hippocampal regions in type 2 diabetes. *Diabetes* 64 (3), 1025e1034;
- 32) Kullmann, S., Heni, M., Veit, R., Scheffler, K., Machann, J., H€aring, H.U., Fritsche, A., Preissl, H., 2017. Intranasal insulin enhances brain functional connectivity mediating the relationship between adiposity and subjective feeling of hunger. *Sci. Rep.* 7 (1), 1627;
- 33) Br€uning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., M€uller-Wieland, D., Kahn, C.R., 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289 (5487), 2122e2125;
- 34) Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., Schwartz, M.W., 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443 (7109), 289e295;
- 35) Hallschmid, M., Benedict, C., Schultes, B., Fehm, H.L., Born, J., Kern, W., 2004b. Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. *Diabetes* 53 (11), 3024e3029;

- 36) Benedict, C., Kern, W., Schultes, B., Born, J., Hallschmid, M., 2008. Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (4), 1339e1344;
- 37) Benedict, C., Brede, S., Schiöth, H.B., Lehnert, H., Schultes, B., Born, J., Hallschmid, M., 2011. Intranasal insulin enhances postprandial thermogenesis and lowers postprandial serum insulin levels in healthy men. *Diabetes* 60 (1), 114e118;
- 38) Guthoff, M., Grichisch, Y., Canova, C., Tschritter, O., Veit, R., Hallschmid, M., Haring, H.U., Preissl, H., Hennige, A.M., Fritsche, A., 2010. Insulin modulates food-related activity in the central nervous. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95 (2), 748e755;
- 39) Hallschmid, M., Higgs, S., Thienel, M., Ott, V., Lehnert, H., 2012. Postprandial administration of intranasal insulin intensifies satiety and reduces intake of palatable snacks in women. *Diabetes* 61 (4), 782e789;
- 40) Jauch-Chara, K., Friedrich, A., Rezmer, M., Melchert, U.H., Scholand-Engler, G.H., Hallschmid, M., Oltmanns, K.M., 2012. Intranasal insulin suppresses food intake via enhancement of brain energy levels in humans. *Diabetes* 61 (9), 2261e2268;
- 41) Iwen, K.A., Scherer, T., Heni, M., Sayk, F., Wellnitz, T., Machleidt, F., Preissl, H., Haring, H.U., Fritsche, A., Lehnert, H., Buettner, C., Hallschmid, M., 2014. Intranasal insulin suppresses systemic but not subcutaneous lipolysis in healthy humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2), E246eE251;
- 42) Apostolatos, A., Song, S., Acosta, S., Peart, M., Watson, J.E., Bickford, P., Cooper, D.R., Patel, N.A., 2012. Insulin promotes neuronal survival via the alternatively spliced protein kinase C δ isoform. *J. Biol. Chem.* 287 (12), 9299e9310;
- 43) Mao, Y.F., Guo, Z., Zheng, T., Jiang, Y., Yan, Y., Yin, X., Chen, Y., Zhang, B., 2016. Intranasal insulin alleviates cognitive deficits and amyloid pathology in young adult APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Aging Cell.* 15 (5), 893e902;
- 44) Salameh, T.S., Bullock, K.M., Hujuel, I.A., Niehoff, M.L., Wolden-Hanson, T., Kim, J., Morley, J.E., Farr, S.A., Banks, W.A., 2015. Central nervous system delivery of intranasal insulin: mechanisms of uptake and effects on cognition. *J. Alzheimers Dis.* 47 (3), 715e728;
- 45) Mamik, M.K., Asahchop, E.L., Chan, W.F., Zhu, Y., Branton, W.G., McKenzie, B.A., Cohen, E.A., Power, C., 2016. Insulin treatment prevents neuroinflammation and neuronal injury with restored neurobehavioral function in models of HIV/AIDS neurodegeneration. *J. Neurosci.* 36 (41), 10683e10695;
- 46) Bell, G.A., Fadool, D.A., 2017. Awake, long-term intranasal insulin treatment does not affect object memory, odor discrimination, or reversal learning in mice. *Physiol. Behav.* 174, 104e113;
- 47) Chen, Y., Zhao, Y., Dai, C.L., Liang, Z., Run, X., Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.X., 2014b. Intranasal insulin restores insulin signaling, increases synaptic proteins, and reduces Ab level and microglia activation in the brains of 3xTg-AD mice. *Exp. Neurol.* 261, 610e619;
- 48) Tejera, D., Heneka, M.T., 2016. Microglia in Alzheimer's disease: the good, the bad and the ugly. *Curr. Alzheimer Res.* 13 (4), 370e380;
- 49) Benedict, C., Hallschmid, M., Hatke, A., Schultes, B., Fehm, H.L., Born, J., Kern, W. 2004. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology* 29 (10), 1326e1334;
- 50) Hallschmid, M., Benedict, C., Schultes, B., Born, J., Kern, W., 2008. Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling. *Int. J. Obes. (Lond)* 32 (2), 275e282;
- 51) Benedict, C., Hallschmid, M., Schmitz, K., Schultes, B., Ratter, F., Fehm, H.L., Born, J., Kern, W., 2007. Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart. *Neuropsychopharmacology* 32 (1), 239e243;
- 52) Benedict, C., Kern, W., Schultes, B., Born, J., Hallschmid, M., 2008. Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (4), 1339e1344;
- 53) Novak, V., Milberg, W., Hao, Y., Munshi, M., Novak, P., Galica, A., Manor, B., Roberson, P., Craft, S., Abduljalil, A., 2014. Enhancement of vasoreactivity and cognition by intranasal insulin in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 37 (3), 751e759;

- 54) Br nner, Y.F., Kofoet, A., Benedict, C., Freiherr, J., 2015. Central insulin administration improves odor-cued reactivation of spatial memory in young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (1), 212e219;
- 55) Reger, M.A., Watson, G.S., Green, P.S., Baker, L.D., Cholerton, B., Fishel, M.A., Plymate, S.R., Cherrier, M.M., Schellenberg, G.D., Frey 2nd, W.H., Craft, S., 2008a. Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid-beta in memory-impaired older adults. *J. Alzheimers Dis.* 13 (3), 323e331;
- 56) Lue, L.F., Sabbagh, M.N., Chiu, M.J., Jing, N., Snyder, N.L., Schmitz, C., Guerra, A., Belden, C.M., Chen, T.F., Yang, C.C., Yang, S.Y., Walker, D.G., Chen, K., Reiman, E.M., 2017. Plasma levels of A β 42 and tau identified probable Alzheimer's dementia: findings in two cohorts. *Front. Aging Neurosci.* 9, 226;
- 57) Reger, M.A., Watson, G.S., Frey 2nd, W.H., Baker, L.D., Cholerton, B., Keeling, M.L., Belongia, D.A., Fishel, M.A., Plymate, S.R., Schellenberg, G.D., Cherrier, M.M., Craft, S., 2006. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiol. Aging* 27 (3), 451e458;
- 58) Feld, G.B., Wilhem, I., Benedict, C., R del, B., Klameth, C., Born, J., Hallschmid, M., 2016. Central nervous insulin signaling in sleep-associated memory formation and neuroendocrine regulation. *Neuropsychopharmacology* 41 (6), 1540e1550;
- 59) Benedict, C., Kern, W., Schultes, B., Born, J., Hallschmid, M., 2008. Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (4), 1339e1344;
- 60) Benedict, C., Dodt, C., Hallschmid, M., Lepiorz, M., Fehm, H.L., Born, J., Kern, W., 2005. Immediate but not long-term intranasal administration of insulin raises blood pressure in human beings. *Metabolism* 54 (10), 1356e1361;
- 61) Reger, M.A., Watson, G.S., Green, P.S., Wilkinson, C.W., Baker, L.D., Cholerton, B., Fishel, M.A., Plymate, S.R., Breitner, J.C., DeGroot, W., Mehta, P., Craft, S., 2008b. Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. *Neurology* 70 (6), 440e448;
- 62) Craft, S., Baker, L.D., Montine, T.J., Minoshima, S., Watson, G.S., Claxton, A., Arbuckle, M., Callaghan, M., Tsai, E., Plymate, S.R., Green, P.S., Leverenz, J., Cross, D., Gerton, B., 2012. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Arch. Neurol.* 69 (1), 29e38;
- 63) Craft, S., Claxton, A., Baker, L.D., Hanson, A.J., Cholerton, B., Trittschuh, E.H., Dahl, D., Caulder, E., Neth, B., Montine, T.J., Jung, Y., Maldjian, J., Whitlow, C., Friedman, S., 2017. Effects of regular and long-acting insulin on cognition and Alzheimer's disease biomarkers: a pilot clinical trial. *J. Alzheimers Dis.* 57 (4), 1325e1334;
- 64) Claxton, A., Baker, L.D., Wilkinson, C.W., Trittschuh, E.H., Chapman, D., Watson, G.S., Cholerton, B., Plymate, S.R., Arbuckle, M., Craft, S., 2013. Sex and ApoE genotype differences in treatment response to two doses of intranasal insulin in adults with mild cognitive impairment or Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 35(4), 789e797;
- 65) Claxton, A., Baker, L.D., Hanson, A., Trittschuh, E.H., Cholerton, B., Morgan, A., Callaghan, M., Arbuckle, M., Behl, C., Craft, S., 2015. Long-acting intranasal insulin detemir improves cognition for adults with mild cognitive impairment or early-stage Alzheimer's disease dementia. *J. Alzheimers Dis.* 44 (3), 897e906;
- 66) Rosenbloom, M.H., Barclay, T.R., Pyle, M., Owens, B.L., Cagan, A.B., Anderson, C.P., Frey 2nd, W.H., Hanson, L.R., 2014. A single-dose pilot trial of intranasal rapidacting insulin in apolipoprotein E4 carriers with mild-moderate Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 28 (12), 1185e1189.