

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Implicación de las alteraciones del nicho neurogénico  
hipocampal adulto en el deterioro cognitivo vascular: estudio  
experimental en roedores**

**The implication of alterations in the adult hippocampal  
neurogenic niche in vascular cognitive impairment : an  
experimental study in rodents**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Enrique Fraga Sierra**

**Directores**

**María Ángeles Moro Sánchez  
Ignacio Lizasoain Hernández  
Jesús Miguel Pradillo Justo**

**Madrid**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

Implicación de las alteraciones del nicho  
neurogénico hipocampal adulto en el deterioro  
cognitivo vascular: estudio experimental en roedores

The implication of alterations in the adult  
hippocampal neurogenic niche in vascular cognitive  
impairment: an experimental study in rodents

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Enrique Fraga Sierra

DIRECTORES

María Ángeles Moro Sánchez  
Ignacio Lizasoain Hernández  
Jesús Miguel Pradillo Justo

# Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Doctorado en Investigación Biomédica



## Tesis Doctoral

Implicación de las alteraciones del nicho neurogénico hipocampal adulto en el deterioro cognitivo vascular: estudio experimental en roedores

The implication of alterations in the adult hippocampal neurogenic niche in vascular cognitive impairment: an experimental study in rodents

Memoria para optar al grado de Doctor

presentada por

Enrique Fraga Sierra

Directores

María Ángeles Moro Sánchez

Ignacio Lizasoain Hernández

Jesús Miguel Pradillo Justo

Memoria presentada por Don Enrique Fraga Sierra para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

La presente tesis ha sido financiada por el proyecto PID2019-106581RB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación, los proyectos TNE-19CVD01 y TNE-21CVD04 de la red Leducq Foundation y por el Instituto de Salud Carlos III y cofinanciada por los fondos europeos de desarrollo “Una manera de hacer Europa” PI20/00535.

# Índice

Abreviaturas .....	7
Resumen .....	9
Abstract .....	12
Introducción .....	14
1. El deterioro cognitivo y la demencia vascular .....	14
1.1 Introducción al deterioro cognitivo vascular .....	14
1.2 Historia de la VD y nacimiento del VCI.....	14
1.3 Diagnóstico y clasificación del VCI.....	16
1.4 Epidemiología del VCI y VD .....	17
2. Mecanismos y fisiopatología del VCI .....	17
2.1 Anatomía de la red cerebrovascular.....	17
2.2 La unidad neurovascular .....	19
2.3 Mecanismos subyacentes al VCI.....	20
2.3.1 Interacción de los mecanismos tisulares, celulares y moleculares.....	22
2.4 Estenosis bilateral de las arterias carótidas .....	23
2.5 Enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo vascular .....	24
3. Eje intestino-cerebro y el efecto del sodio en la dieta.....	26
3.1 El eje intestino-cerebro .....	26
3.2 Consumo de dietas altas en sodio .....	27
4. El hipocampo.....	29
4.1 Estructura.....	29
4.2 Circuitos y función hipocampal.....	31
4.3 Neurogénesis hipocampal adulta .....	32
4.3.1 Cascada neurogénica .....	32
Hipótesis y objetivos.....	36
Hipótesis .....	36
Objetivos.....	36
Objetivo general.....	36
Materiales y métodos.....	38

1. Normativa de experimentación con animales .....	38
2. Modelos animales utilizados.....	38
2.1 Modelo de estenosis bilateral de las arterias carótidas (BCAS) .....	38
2.2 Modelo de dieta alta en sodio (HSD).....	38
2.3 Modelo de la enfermedad de Alzheimer (APP <sup>NL-F</sup> ).....	39
3. Pruebas de comportamiento.....	39
3.1 Prueba de nueva localización de objeto (NOL, del inglés <i>Novel Object Location</i> ).....	40
3.2 Reconocimiento de nuevo objeto (NOR, del inglés <i>Novel Object Recognition</i> ) .....	40
3.3 Prueba de campo abierto (OF, del inglés <i>Open Field</i> ).....	41
3.4 Test de las alternancias espontaneas (SAP, del inglés <i>Spontaneous Alternation Performance</i> ) .....	42
3.5 Prueba de condicionamiento al miedo contextual (CFC, del inglés <i>Contextual Fear Conditioning</i> ) .....	42
4. Técnicas experimentales in vivo.....	43
4.1 Estudio de permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) .....	43
4.2 Arterial Spin Labelling (ASL).....	43
4.3 Medida de la presión arterial.....	44
4.4 Medidas de parámetros bioquímicos y hematológicos.....	44
5. Técnicas experimentales ex vivo.....	44
5.1 Sacrificio de los animales y obtención de muestras.....	44
5.2 Histología.....	45
5.3 Extracción de proteínas y <i>western-blot</i> s.....	47
5.4 Análisis de expresión génica mediante qRT-PCR.....	49
6. Cuantificaciones y análisis.....	50
6.1 Cuantificación del número de neuroblastos.....	50
6.2 Cuantificación de los neuroblastos proliferativos.....	50
6.3 Estudio de la morfología de los neuroblastos.....	50
6.4 Análisis de la muerte celular .....	50
6.5 Cuantificación de los astrocitos del giro dentado .....	50
6.6 Cuantificación de las poblaciones del nicho neurogénico hipocampal .....	51
6.7 Análisis estadístico.....	51

Resultados.....	52
1. Estudio del efecto de la hipoperfusión cerebral global crónica mediante un modelo de estenosis bilateral de las arterias carótidas (BCAS) .....	52
1.1 Descripción del modelo de hipoperfusión BCAS.....	52
1.1.1 Evaluación del flujo sanguíneo cerebral en el modelo murino de estenosis bilateral de las arterias carótidas comunes .....	52
1.1.2 Efecto de la hipoperfusión cerebral crónica sobre las características volumétricas del hipocampo.....	52
1.1.3 Efecto de tres meses de hipoperfusión cerebral sobre el estado inflamatorio.....	54
1.2 Estudio del efecto de la hipoperfusión cerebral crónica en el modelo BCAS sobre la función cognitiva .....	55
1.3 Evaluación del efecto de la hipoperfusión cerebral crónica sobre la neurogénesis hipocampal en el modelo BCAS y los mecanismos implicados.....	56
1.3.1 Estudio del efecto de la hipoperfusión cerebral crónica sobre la formación de nuevas neuronas granulares en el giro dentado .....	56
1.3.2 Efecto de la hipoperfusión cerebral sobre la apoptosis en el hipocampo .....	58
1.3.3 Efecto de la hipoperfusión cerebral sobre la proliferación de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo .....	59
1.4 Evaluación de la implicación de los signos histopatológicos típicos de la enfermedad de Alzheimer en el efecto producido por la hipoperfusión cerebral crónica inducida por BCAS.....	59
1.4.1 Efecto de la hipoperfusión cerebral sobre la fosforilación de TAU .....	59
1.4.2 Estudio de la hipoperfusión crónica como factor coadyuvante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer .....	61
2. Estudio de las consecuencias del consumo elevado de sodio en la dieta sobre la función cognitiva y la homeostasis hipocampal .....	67
2.1 Descripción del modelo murino de dieta alta en sal.....	67
2.1.1 Estudio del efecto de una dieta alta en sal (4% NaCl) sobre la presión sanguínea del ratón .....	67
2.1.2 Análisis del impacto de una dieta alta en sodio sobre la perfusión cerebral.....	67
2.1.3 Efectos hematológicos y bioquímicos del consumo elevado de sal en la dieta.....	69
2.1.4 Efecto de una dieta alta en sodio sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica ..	69
2.2 Evaluación del efecto de la HSD sobre la función cognitiva .....	71

2.2.1 Efecto de 5 semanas de HSD en la memoria episódica y en la memoria espacial de trabajo .....	71
2.2.2 Efecto de 10-12 semanas de HSD en la memoria episódica y de reconocimiento .....	74
2.3 Estudio del efecto de la HSD sobre la neurogénesis hipocampal .....	74
2.4 Evaluación del efecto de la HSD sobre la dinámica del nicho neurogénico hipocampal .....	75
2.4.1 Efecto de una HSD sobre los cambios del nicho neurogénico hipocampal anteriores a los cambios observados en los neuroblastos.....	75
2.4.2 Efecto de una HSD sobre los cambios del nicho neurogénico hipocampal simultáneos a las alteraciones en la neurogénesis .....	77
4.4.3 Efecto de la HSD sobre los cambios del nicho neurogénico hipocampal a largo plazo .....	79
<b>Discusión</b> .....	<b>81</b>
1. Efecto de la hipoperfusión cerebral global crónica inducida por el modelo de BCAS sobre la función cognitiva, la homeostasis hipocampal y la EA .....	81
1.1 Caracterización del modelo de hipoperfusión por BCAS .....	81
1.2 La hipoperfusión cerebral crónica inducida por BCAS provoca déficits de memoria espacial de trabajo y de referencia .....	82
1.3 La hipoperfusión cerebral crónica altera la neurogénesis hipocampal adulta de manera concomitante al deterioro cognitivo observado .....	83
1.4 Efecto de la hipoperfusión sobre signos histopatológicos de la EA.....	86
1.4.1 La hipoperfusión cerebral provoca una mayor fosforilación de la proteína TAU .....	86
1.4.2 La hipoperfusión cerebral crónica constituye un factor coadyuvante en el desarrollo de la EA .....	87
1.5 Resumen de los efectos de la hipoperfusión producida por BCAS .....	89
2. Efecto de la dieta alta en sodio sobre la función cognitiva y la homeostasis hipocampal .....	89
2.1 Caracterización del modelo murino de dieta alta en sal .....	89
2.2 La dieta alta en sal induce deterioro cognitivo de la memoria episódica contextual .....	91
2.3 La dieta alta en sal compromete la neurogénesis hipocampal cualitativa y cuantitativamente ..	92
2.4 Efecto de la dieta alta en sal sobre la dinámica del nicho neurogénico hipocampal.....	94
2.4.1 La dieta alta en sal disminuye la proliferación de las células ANP previamente a la reducción del número de neuroblastos.....	94
2.4.2 La dieta alta en sal provoca un incremento del número de astrocitos en la zona subgranular concomitante a la reducción del número de neuroblastos .....	95

2.4.3 El incremento del número de astrocitos en la SGZ causado por la dieta alta en sal perdura en el tiempo hasta las diez semanas de dieta .....	96
2.5 Resumen de los efectos del consumo de una dieta alta en sal .....	96
3. Resumen global .....	97
Conclusiones .....	100
Bibliografía.....	102

## Abreviaturas

<b>AGI</b>	Aparato GastroIntestinal
<b>AHN</b>	Adult Hipocampal Neurogenesis (neurogénesis hipocampal adulta)
<b>ANOVA</b>	ANalysis Of VAriance (análisis de la varianza)
<b>ANP</b>	Amplifying Neural Progenitors (progenitores neurales amplificadores)
<b>ASL</b>	<i>Arterial Spin Labelling</i> (marcaje arterial por spin)
<b>BCAS</b>	<i>Bilateral Common Carotid Stenosis</i> (estenosis bilateral de las arterias carótidas)
<b>BHE</b>	Barrera Hematoencefálica
<b>CA</b>	Cornu Ammonis
<b>CE</b>	Corteza Entorrinal
<b>CFC</b>	<i>Contextual Fear Conditioning</i> (prueba de condicionamiento al miedo contextual)
<b>CG</b>	Capa Granular
<b>cGMP</b>	<i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i> (guanosin-monofosfato cíclico)
<b>CM</b>	Capa Molecular
<b>cSVD</b>	<i>Cerebral Small Vessel Disease</i> (enfermedad de vaso pequeño cerebral)
<b>DG</b>	<i>Dentate Gyrus</i> (giro dentado)
<b>DLB</b>	<i>Lewis Bodies Dementia</i> (Demencia con cuerpos de Lewy)
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>FA</b>	<i>Formic Acid</i> (Ácido fórmico)
<b>eNOS</b>	<i>Endothelial Nitric Oxide Sintase</i> (óxido nítrico sintasa endotelial)
<b>FSC</b>	Flujo Sanguíneo Cerebral
<b>HSD</b>	<i>High Sodium Diet</i> (dieta alta en sodio)
<b>IHQ</b>	InmunoHistoQuímica
<b>MVCI</b>	<i>Mild Vascular Cognitive Impairment</i> (deterioro cognitivo vascular leve)
<b>NCI</b>	<i>Non Cognitive Impaired</i> (sin deterioro cognitivo)
<b>NO</b>	<i>Nitric Oxide</i> (óxido nítrico)
<b>NOL</b>	<i>Novel Object Location test</i> (prueba de nueva localización de objeto)
<b>NOR</b>	<i>Novel Object Recognition test</i> (prueba de reconocimiento de nuevo objeto)
<b>NOS</b>	<i>Nitric Oxide Sintase</i> (óxido nítrico sintasa)
<b>NSC</b>	Neural Stem Cell (célula madre neural)
<b>OF</b>	<i>Open Field</i> (prueba de campo abierto)

<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PFA</b>	Para-FormAldehído
<b>PSD</b>	<i>Post-Stroke Dementia</i> (demencia post-ictus)
<b>PSV</b>	<i>PeriVascular Space</i> (espacio perivascular)
<b>PVDF</b>	<i>PolyVinylidene Fluoride</i> (fluoruro de polivideno)
<b>PVM</b>	<i>PeriVascular Macrophage</i> (macrófago perivascular)
<b>QNP</b>	<i>Quiescent Neural Progenitor</i> (progenitores neurales quiescentes)
<b>RGL</b>	<i>Radial Glia-Like</i> (células radiales como la glía)
<b>RNA</b>	<i>RiboNucleic Acid</i> (ácido ribonucleico)
<b>ROI</b>	<i>Region Of Interest</i> (región de interés)
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i> (especies reactivas de oxígeno)
<b>RT-qPCR</b>	<i>RetroRranscription Quantitative PCR</i> (PCR en tiempo real seguida de retrotranscripción)
<b>SAP</b>	<i>Spontaneous Alternation Performance test</i> (Test de las alternancias espontáneas)
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida)
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Mean</i> (error estándar de la media)
<b>SGZ</b>	<i>SubGranular Zone</i> (zona subgranular)
<b>SLM</b>	Stratum LacunosuM
<b>SMC</b>	<i>Smooth Muscle Cell</i> (célula muscular lisa)
<b>SO</b>	Stratum Oriens
<b>SP</b>	Stratum Pyramidale
<b>SR</b>	Stratum Radiatum
<b>VCI</b>	<i>Vascular Cognitive Impairment</i> (deterioro cognitivo vascular)
<b>VD</b>	<i>Vascular Dementia</i> (demencia vascular)
<b>VICCCS</b>	<i>Vascular Impairment of Cognition Classification Consensus Study</i> (estudio consenso para la clasificación del deterioro cognitivo vascular)

## Resumen

La demencia es el deterioro grave de las funciones cerebrales impidiendo la autonomía en la vida diaria. La demencia considerada más prevalente actualmente es la enfermedad de Alzheimer, seguida por la demencia de origen vascular y la que combina estos dos tipos. Más ampliamente, el deterioro cognitivo vascular se refiere a todo el espectro de alteraciones cognitivas que cursa debido a causas vasculares, y que comprende desde el deterioro cognitivo vascular leve hasta la demencia vascular.

Las demencias no han dejado de ganar relevancia sanitaria y socioeconómica en los últimos años debido al crecimiento de la esperanza de vida y al incremento de prevalencia de las enfermedades asociadas al envejecimiento. La enfermedad de Alzheimer ha sido postulada como hegemónica durante décadas, considerando casi toda demencia como enfermedad de Alzheimer y haciéndolas sinónimas. Sin embargo, en las últimas décadas se ha profundizado en la investigación de esta patología arrojando luz sobre su complejidad y sobre la diversidad de causas que pueden contribuir al deterioro cognitivo. Entre ellas, han destacado los factores vasculares, y los minuciosos estudios post-mortem cada vez señalan con mayor claridad que la demencia vascular podría ser tan frecuente como la enfermedad de Alzheimer y que se encuentra infradiagnosticada. Un correcto diagnóstico del tipo de demencia o del deterioro cognitivo serán cruciales para poder manejar adecuadamente al paciente y para poner los esfuerzos en investigar las causas más relevantes de esta patología. Además, emerge también con fuerza la componente vascular de la propia enfermedad de Alzheimer, volviendo al origen de su descubrimiento. Es conocido que los depósitos de A $\beta$  tienen efectos perjudiciales sobre el endotelio, la autorregulación vascular y la inflamación, pero también se hipotetiza que los daños vasculares extracraneales tempranos puedan influir en la acumulación de A $\beta$  y en la agregación de TAU. Estos datos hacen necesario revisar el abordaje que se ha hecho de la investigación de la enfermedad de Alzheimer y de las demencias en general.

El flujo sanguíneo cerebral es un parámetro fina y crucialmente regulado coordinadamente por las células del cerebro (neuronas, astrocitos) y los propios vasos sanguíneos. Su adaptación a las necesidades cerebrales es esencial para el correcto desempeño de sus funciones. Por ello, la pérdida de la capacidad de regulación del flujo y otras causas, como la hipoperfusión global o la isquemia, que conducen a un desacoplamiento entre las necesidades y el aporte sanguíneo tienen graves consecuencias para las funciones cognitivas y es una de las principales causas vasculares que se relacionan con el desarrollo de deterioro cognitivo vascular. La hipoperfusión cerebral causa hipoxia, limitación del aporte de nutrientes y reducción del aclaramiento de desechos tóxicos y estos, a su vez, estrés oxidativo, inflamación, disfunción endotelial y de la barrera hematoencefálica y un fallo de la homeostasis cerebral.

Asimismo, el cerebro está muy influenciado por el estado del resto del organismo; particularmente, se ha demostrado que el eje formado por el intestino, el sistema inmune y el cerebro tiene un rol central. Siendo esta, una vía de interconexión bidireccional por la que el cerebro influye en el estado inflamatorio sistémico y en el intestino; y el intestino, la microbiota y el sistema inmunológico influyen relevantemente en la homeostasis cerebral. Recientemente se ha demostrado, en un modelo murino, que el consumo de una dieta alta en sal puede causar una disminución del flujo sanguíneo cerebral dependientemente de una

desregulación de la vía del óxido nítrico en los vasos sanguíneos cerebrales, reduciendo el rendimiento cognitivo.

A pesar de todos los estudios realizados tanto en cohortes humanas como con diferentes modelos murinos los mecanismos precisos y la secuencia de acontecimientos causa-efecto que conducen al deterioro cognitivo permanecen sin esclarecerse. Son conocidos los efectos perjudiciales que todos los mecanismos expuestos anteriormente tienen sobre la sustancia blanca, fundamental para la comunicación de las distintas estructuras cerebrales y su respuesta coordinada, y sobre el hipocampo, una región especialmente sensible a la hipoperfusión y esencial para la memoria y el aprendizaje. La neurogénesis adulta una de las características propias y fundamentales del hipocampo ha sido descrita como una de las dianas patológicas en otros escenarios relacionados con el deterioro cognitivo vascular como el ictus o la enfermedad de Alzheimer, sin embargo apenas ha sido estudiada en este contexto.

Por tanto, hipotetizamos que una alteración de la neurogénesis hipocampal pueda contribuir a originar el deterioro cognitivo vascular, por lo que los modelos experimentales de deterioro cognitivo vascular causarían un deterioro cognitivo hipocampo-dependiente relacionado con alteraciones de la dinámica de división, diferenciación y maduración del nicho neurogénico, pudiendo desembocar en signos histopatológicos tradicionalmente asociados a la EA. Y se marca como objetivo principal de esta tesis doctoral el estudio de la neurogénesis hipocampal adulta y sus capacidades cognitivas asociadas en dos modelos de deterioro cognitivo vascular: la estenosis bilateral de las arterias carótidas y la dieta alta en sodio.

Para la investigación de la hipótesis se ha trabajado con el modelo de hipoperfusión cerebral crónica mediante la estenosis de las arterias carótidas comunes, que lleva años siendo utilizado por la comunidad científica como modelo de enfermedad de pequeño vaso y de deterioro cognitivo vascular, y el modelo de la enfermedad de Alzheimer APP<sup>NL-F</sup>. También se ha utilizado un modelo de dieta alta en sal con el fin de profundizar en la relación entre el eje intestino-cerebro y el deterioro cognitivo vascular. Para la evaluación de la neurogénesis, las poblaciones del nicho neurogénico y la muerte celular se han empleado inmunofluorescencias. Para la cuantificación de la expresión de citoquinas se utilizó la PCR en tiempo real. Y para la evaluación cognitiva se emplearon los test de reconocimiento de nuevo objeto y de nueva localización, de condicionamiento al miedo contextual, de campo abierto y de alternancias espontáneas.

Los resultados contenidos en esta tesis doctoral muestran como los dos modelos de deterioro cognitivo vascular empleados producen un déficit de las capacidades cognitivas como resultado de una alteración cuantitativa y cualitativa de la neurogénesis y explora los posibles mecanismos subyacentes a la disminución del número de nuevas neuronas. En el modelo de estenosis bilateral de las carótidas encontramos una muerte celular incrementada en el giro dentado y una reducción de la proliferación de los neuroblastos. En el modelo de dieta alta en sodio observamos previamente a los cambios neurogénicos una reducción en el número de células progenitoras amplificadoras y un sostenido incremento del número de astrocitos en la zona subgranular. Finalmente se muestra como la

hipoperfusión constituye un factor contribuyente a los hitos histopatológicos de la enfermedad de Alzheimer.

Por tanto, este estudio de los modelos de deterioro cognitivo vascular muestra la implicación del hipocampo y la neurogénesis en la alteración de la memoria episódica, así como diferentes mecanismos subyacentes en cada modelo a las alteraciones observadas de las neuronas granulares inmaduras. De este modo, contribuye a la comprensión de la contribución que la hipoperfusión y el eje intestino-cerebro tienen sobre el deterioro cognitivo vascular y, concretamente, sobre la neurogénesis y la memoria dependiente de esta.

## Abstract

Dementia is the severe impairment of brain functions that impedes autonomy in daily life. Currently, the most prevalent form of dementia is Alzheimer's disease, followed by vascular dementia and the combination of these two types. More broadly, vascular cognitive impairment refers to the entire spectrum of cognitive alterations caused by vascular factors, ranging from mild vascular cognitive impairment to vascular dementia.

Dementia has gained increasing importance in healthcare and socio-economic terms in recent years due to the growth in life expectancy and the increasing prevalence of aging-related diseases. Alzheimer's disease has been considered dominant for decades, with almost all dementia cases being diagnosed as Alzheimer's disease. However, research into this pathology has deepened in recent decades, shedding light on its complexity and the diversity of causes that can contribute to cognitive decline. Among these, vascular factors have gained prominence, and meticulous post-mortem studies increasingly suggest that vascular dementia could be as common as Alzheimer's disease and is underdiagnosed. Accurate diagnosis of the type of dementia or cognitive impairment will be crucial for properly managing patients and focusing efforts on investigating the most relevant causes of this condition. Additionally, the vascular component of Alzheimer's disease itself is gaining strength, returning to the origins of its discovery. It is known that A $\beta$  deposits have harmful effects on the endothelium, vascular autoregulation, and inflammation, but it is also hypothesized that early extracranial vascular damage may influence the accumulation of A $\beta$  and the aggregation of TAU. These data demand a reevaluation of the approach to Alzheimer's disease and dementia research in general.

Cerebral blood flow is a finely and crucially regulated parameter coordinated by brain cells (neurons, astrocytes) and the blood vessels themselves. Its adaptation to cerebral needs is essential for proper brain function. Therefore, the loss of flow regulation capacity and other factors, such as global hypoperfusion or ischemia, which lead to a mismatch between needs and blood supply, have serious consequences for cognitive functions and are one of the main vascular causes related to the development of vascular cognitive impairment. Cerebral hypoperfusion causes hypoxia, limits nutrient supply, reduces toxic waste clearance, and, in turn, leads to oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction, blood-brain barrier dysfunction, and cerebral homeostasis failure.

Furthermore, the brain is highly influenced by the state of the rest of the body. Particularly, the axis formed by the gut, the immune system, and the brain plays a central role. This is a bidirectional interconnection through which the brain influences systemic inflammatory status and the gut, while the gut, microbiota, and immune system significantly affect brain homeostasis. Recent research in a murine model has shown that a high-salt diet can cause a decrease in cerebral blood flow, depending of the dysregulation of the nitric oxide pathway in cerebral blood vessels, leading to reduced cognitive performance.

Despite numerous studies in human cohorts and various murine models, the precise mechanisms and the cause-effect sequence leading to cognitive decline remain unclear. The detrimental effects of all the mechanisms mentioned above are well-known on white matter, essential for communication between

different brain structures and their coordinated response, and on the hippocampus, a region particularly sensitive to hypoperfusion and essential for memory and learning. Adult neurogenesis, a fundamental characteristic of the hippocampus, has been described as one of the pathological targets in other scenarios related to vascular cognitive impairment, such as stroke or Alzheimer's disease, but has been scarcely studied in this context.

Therefore, we hypothesize that an alteration in hippocampal neurogenesis may contribute to the onset of vascular cognitive impairment. Thus, experimental models of vascular cognitive impairment would result in hippocampus-dependent cognitive impairment related to changes in the dynamics of neurogenic niche division, differentiation, and maturation, potentially leading to histopathological signs traditionally associated with Alzheimer's disease. The main objective of this doctoral thesis is to study adult hippocampal neurogenesis and its associated cognitive capacities in two models of vascular cognitive impairment: bilateral carotid artery stenosis and a high-sodium diet.

To investigate this hypothesis, we have worked with the model of chronic cerebral hypoperfusion through bilateral common carotid artery stenosis, which has been used by the scientific community for years as a model of small vessel disease and vascular cognitive impairment, and the APPNL-F model of Alzheimer's disease. We have also used a high-salt diet model to deepen into the relationship between the gut-brain axis and vascular cognitive impairment. For the assessment of neurogenesis, neurogenic niche populations, and cell death, immunofluorescence techniques were employed. Real-time PCR was used for cytokine expression quantification. Cognitive evaluation included tests for novel object recognition, novel object location, contextual fear conditioning, open field, and spontaneous alternation.

The results presented in this doctoral thesis show how the two models of vascular cognitive impairment used produce deficits in cognitive abilities due to quantitative and qualitative alterations in neurogenesis and explore the possible underlying mechanisms behind the decrease in the number of neuroblasts. In the bilateral carotid artery stenosis model, we observed increased cell death in the dentate gyrus and a reduction in neuroblast proliferation. In the high-salt diet model, prior to neurogenic changes, we observed a reduction in the number of amplifying progenitor cells and a sustained increase in the number of astrocytes in the subgranular zone. Finally, we demonstrate how hypoperfusion contributes to the histopathological milestones of Alzheimer's disease.

Therefore, this study of vascular cognitive impairment models highlights the involvement of the hippocampus and neurogenesis in the alteration of episodic memory, as well as different underlying mechanisms in each model for the observed changes in immature granule neurons. Thus, it contributes to the understanding of the role that hypoperfusion and the gut-brain axis play in vascular cognitive impairment and, specifically, in neurogenesis and its memory-dependent aspects.

# Introducción

## 1. El deterioro cognitivo y la demencia vascular

### 1.1 Introducción al deterioro cognitivo vascular

La esperanza de vida, a la vez que la edad media de la población, ha incrementado linealmente en los últimos siglos (He et al., 2016; Kirkwood, 2008) desencadenando una fuerte elevación de la incidencia de las enfermedades asociadas al envejecimiento. Mientras que los avances en prevención y cuidado de la salud han mejorado la esperanza de vida, a nivel global, la carga de enfermedad se ha desplazado de tal forma que las enfermedades no transmisibles son uno de los mayores retos a nivel sanitario y social. Entre ellas, la demencia es una de las afecciones neurológicas más comunes: se estima que afectaba mundialmente a 46,8 millones de personas en 2015, con un coste social asociado de 818 mil millones de dólares (Wolters & Ikram, 2019). Además, el envejecimiento poblacional no hace sino empeorar estas cifras en las predicciones para la próxima década (Wu et al., 2017) y las siguientes, estimándose una prevalencia de 150 millones de personas para 2050 (Iadecola et al., 2019).

De este modo, “el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento se ha posicionado como uno de los principales desafíos de salud pública en la actualidad. Aunque la enfermedad de Alzheimer es la causa más prevalente de demencia clínicamente diagnosticada, el deterioro cognitivo de etiología vascular es la segunda causa más común” (Iadecola et al., 2019) y probablemente se encuentre infradiagnosticado (Azarpazhooh et al., 2018).

El deterioro cognitivo vascular (VCI, del inglés *Vascular Cognitive Impairment*) comprende todas las formas de deterioro cognitivo asociadas con enfermedades cerebrovasculares, independientemente de la causa vascular subyacente y sin importar la aparición de síntomas de episodio cerebrovascular agudo. Es un concepto amplio que abarca todo el espectro, desde el deterioro cognitivo vascular leve (MVCI vascular, del inglés *Mild Vascular Cognitive Impairment*) hasta la demencia vascular (VD, del inglés *Vascular Dementia*) e incluye casos con patologías mixtas, como patologías vasculares y de tipo Alzheimer (Gorelick et al., 2011). Entre los posibles orígenes vasculares se encuentran: la enfermedad de pequeño vaso, los infartos múltiples o únicos, territoriales o pequeños, y los infartos estratégicos, entre otros. (Fig. 1) (Dichgans & Leys, 2017; Hachinski et al., 2006; O'Brien et al., 2003; Skrobot et al., 2016).

### 1.2 Historia de la VD y nacimiento del VCI

Alois Alzheimer, quien descubrió la demencia que lleva su nombre, la enfermedad de Alzheimer (EA), fue el primero en defender el origen vascular de la demencia (Alzheimer et al., 1995; Mast et al., 1995). Las afecciones de los vasos sanguíneos fueron, de este modo, relacionadas con el deterioro cognitivo durante muchas décadas. La hipótesis planteada fue la de la vasoparálisis global, por la cual las arterias se endurecían afectando a la capacidad de los vasos sanguíneos cerebrales para contraerse y relajarse, regulando así el flujo sanguíneo que llega al cerebro y respondiendo a las necesidades metabólicas de

este órgano, lo que causaba muerte neuronal. Esta teoría fue la dominante hasta la década de 1970, cuando se demostró que las arterias y venas conservaban la capacidad de adaptar el flujo sanguíneo cerebral incluso en pacientes con deterioro cognitivo (Hachinski et al., 1975), lo que puso en duda la hipótesis de la vasoparálisis global e insuficiencia vascular. Al mismo tiempo, apareció una hipótesis alternativa: la demencia multiinfarto, que proponía como mecanismo de la demencia la aparición de múltiples infartos cerebrales (Hachinski et al., 1974) y que se convirtió en un nuevo argumento en contra del concepto de hipoperfusión e insuficiencia globales. La demencia multiinfarto abrió un horizonte de esperanza en la prevención de la demencia puesto que, si la aparición de los infartos cerebrales era prevenible, así también lo sería la demencia. Posteriormente, se consideró restringir la demencia vascular (VD) a la forma más severa del nuevo término (ya presentado), el deterioro cognitivo vascular, que abarca todo el espectro de alteraciones cognitivas causadas por factores vasculares (Hachinski & Bowler, 1993), y que ha sido ampliamente adoptado (Iadecola, 2013; Iadecola et al., 2019).

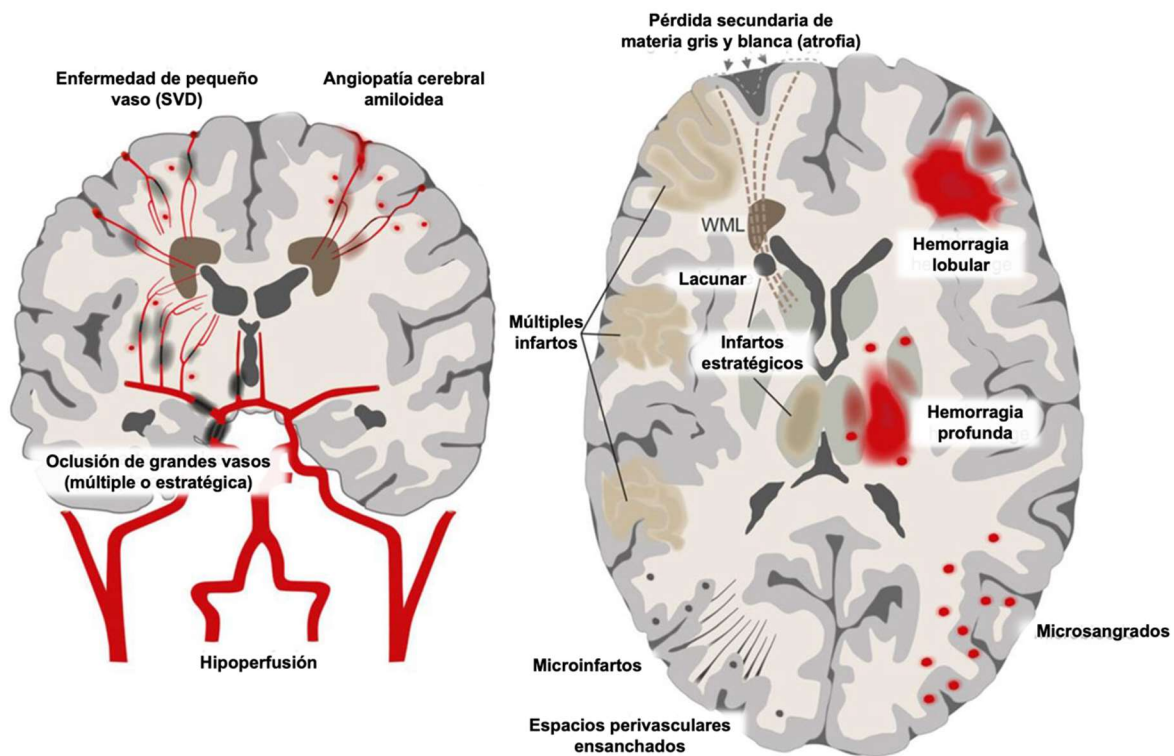


Fig. 1. Principales causas del deterioro cognitivo vascular. Adaptado de (Dichgans & Leys, 2017).

“Con los avances en la comprensión de la patología molecular de la enfermedad de Alzheimer en la década de 1990 (Selkoe & Hardy, 2016), el término demencia se volvió sinónimo de la enfermedad de Alzheimer, y el impacto cognitivo de la patología vascular fue pasado por alto en comparación con la patología neurodegenerativa (como placas de amiloide y ovillos neurofibrilares). Más recientemente, una gran cantidad de observaciones epidemiológicas, clínico-patológicas y científicas básicas ha llevado a una reevaluación del papel de los factores vasculares en el deterioro cognitivo (Iadecola, 2004), identificando la disfunción y el daño vascular como componentes críticos en la fisiopatología de la demencia en la vejez, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Iadecola, 2017).” (Iadecola et al., 2019).

### 1.3 Diagnóstico y clasificación del VCI

La guía recientemente publicada como resultado del estudio de clasificación consensuado sobre el deterioro cognitivo vascular (VICCCS, del inglés *Vascular Impairment of Cognition Classification Consensus Study*), liderado por la doctora Olivia Skrobot, exige como primer criterio diagnóstico la evidencia de enfermedad cerebrovascular en estudios de imagen, y en segundo lugar, el déficit clínicamente significativo en al menos 1 dominio cognitivo. Deberá ser de la suficiente gravedad como para causar una interrupción severa de las actividades de la vida diaria para el diagnóstico de la forma más severa de VCI, la demencia vascular. El diagnóstico se clasifica como probable o posible en función de si existe evidencia concluyente de una relación causal entre la enfermedad vascular y el síndrome cognitivo. Los cinco dominios cognitivos que deben ser evaluados con el fin de diagnosticar el VCI son: la atención, la memoria, el lenguaje, la función ejecutiva y la visual-espacial. Además de estos podrían incorporarse adicionalmente otros: la habilidad social, una prueba neuropsiquiátrica o la capacidad de aprendizaje. Los cinco primeros pueden ser evaluados en las llamadas pruebas de los “60 minutos” y “30 minutos” como avala el VICCCS (Hachinski et al., 2006; Iadecola et al., 2019; Skrobot et al., 2018). Según el VICCCS, la DV se puede clasificar, atendiendo a su etiología, en 4 subtipos principales: 1) demencia post-ictus, definida como demencia que se manifiesta en los 6 meses siguientes a un ictus; 2) demencia vascular isquémica subcortical; 3) demencia multiinfarto; y 4) demencia mixta (Fig. 2) (Skrobot et al., 2018).

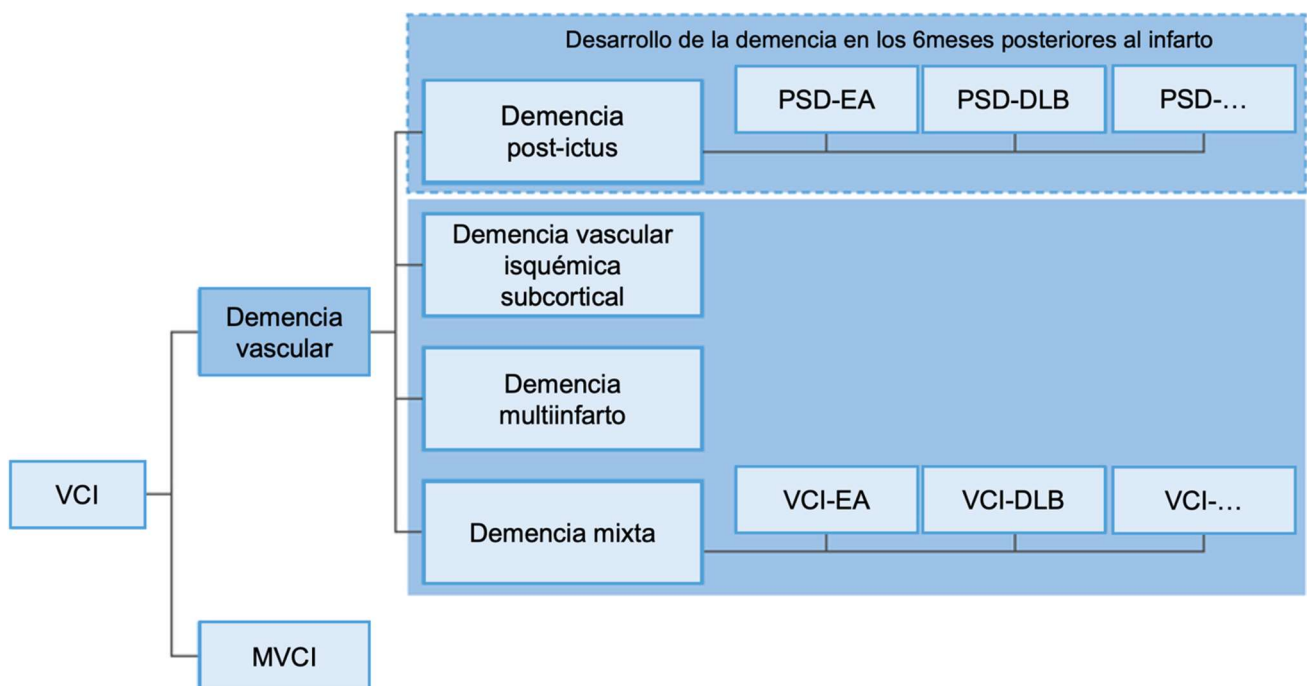


Fig. 2. Clasificación del deterioro cognitivo vascular de acuerdo con las guías VICCCS. PSD: Demencia post-ictus, DLB: Demencia con cuerpos de Lewy. Adaptado de (Iadecola et al., 2019).

El diagnóstico de enfermedad vascular cerebral suele ser, hoy en día, sencillo y, en determinados casos, la relación con el síndrome cognitivo es clara; particularmente, en el caso de las formas hereditarias de VCI, sobre todo cuando se manifiestan en la juventud. También los casos de demencia post-ictus, si el

sujeto presentaba una capacidad cognitiva normal con anterioridad. Para el resto de las etiologías, esta relación no es tan evidente, incluyendo todos aquellos pacientes que desarrollan un deterioro cognitivo progresivo meses o años después del episodio cerebrovascular o sin antecedentes de éste. En estos casos, algunos aspectos que apoyan la relación incluyen lesiones vasculares extensas (múltiples o grandes), lesiones vasculares en regiones estratégicas del cerebro o evidencia de angiopatía amiloide cerebral en neuroimagen (Dichgans & Leys, 2017; Hachinski et al., 2006). La guía VICCCS requiere, para el diagnóstico de VD o VCI leve, resonancia magnética (RM) y evidencia de lesiones vasculares que se encuadren en uno de los subtipos diagnósticos principales (Iadecola et al., 2019).

## 1.4 Epidemiología del VCI y VD

La demencia está estrechamente relacionada con el envejecimiento y su incidencia juvenil suele estar asociada a alteraciones genéticas. En los países desarrollados, la incidencia y la prevalencia de la demencia aumentan exponencialmente a partir de los 75 años; sin embargo, estas han disminuido en las últimas décadas, asociado a las mejoras en la educación, las condiciones de vida y la atención médica. Además, siguiendo el espectro, las formas más leves de VCI son más frecuentes en la población más joven y las formas más severas en la población más anciana (Iadecola et al., 2019).

En marzo de 2023, más de 55 millones de personas padecían demencia. De las cuales podemos calcular que unos 14,3 millones sufrían demencia vascular pura y 14,9 millones demencia mixta (EA-vascular) (OMS, who.org, consultada en julio de 2023) (Azarpazhooh et al., 2018).

## 2. Mecanismos y fisiopatología del VCI

### 2.1 Anatomía de la red cerebrovascular

El cerebro, como uno de los órganos con mayor actividad metabólica del organismo, requiere de un suministro continuo de sangre para suplir sus necesidades de nutrientes y energía (altamente dinámicas y regionalmente diversas). Para ello cuenta con una sofisticada red vascular que entra en contacto íntimo con los propios componentes cerebrales. Además de la función de suministro energético, el sistema vascular cerebral debe asegurar una correcta eliminación de subproductos potencialmente tóxicos, facilitar el tráfico neuro-inmune y mantener el equilibrio homeostático (Santisteban & Iadecola, 2018; Schaeffer & Iadecola, 2021).

La red vascular que riega al cerebro parte desde la superficie cerebral hasta las regiones más internas, ramificándose en el proceso. Así, las arterias piales circundan el parénquima, y desde ellas parten arterias penetrantes que se adentran en el mismo. Otras arterias penetrantes surgen del polígono de Willis, nombre que recibe la estructura vascular ubicada en la base del cerebro en la que las arterias carótidas internas se ponen en comunicación y se genera una red de arterias que abastecen al cerebro adentrándose en el parénquima (Fig. 3) (Iadecola, 2017). Los vasos penetrantes tienen pocas ramas colaterales, y esta baja colateralidad repercute en la sensibilidad de las estructuras subcorticales

cerebrales a la oclusión de un solo vaso, que en muchos casos es suficiente para causar infartos lacunares (lesiones isquémicas pequeñas y localizadas) (Shih et al., 2013). De igual modo, la sustancia blanca subcortical es también muy sensible al flujo sanguíneo cerebral (Iadecola et al., 2019).

Paralelamente al sistema vascular cerebral existe un sistema de espacios perivasculares (Virchow-Robin) o sistema glinfático que sirve como vía de drenaje de productos de desecho. Este sistema está compuesto por los espacios que rodean a los vasos cerebrales delimitados por la glía (especialmente los astrocitos), y se encuentra íntimamente conectado al líquido cefalorraquídeo y a los ganglios linfáticos. Cumple funciones esenciales, además de la detoxificación, como el transporte de células inmunes o de fibroblastos. La fuerza que dirige el flujo se cree que es una combinación de la contractilidad arterial, de fuerzas de difusión y de corrientes de convección entre los espacios perivasculares arteriales y venosos. (Da Mesquita et al., 2018; Faraco et al., 2017; Mestre et al., 2020; Vanlandewijck et al., 2018).

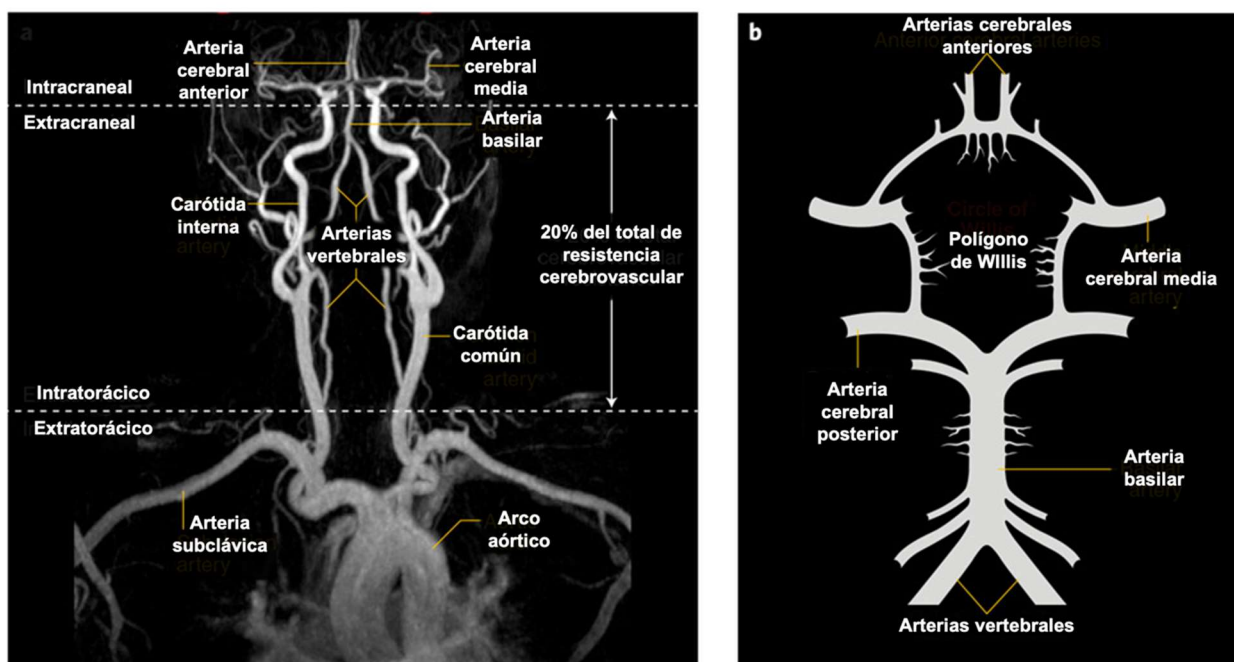


Fig. 3. Anatomía de la red vascular que abastece al cerebro. Adaptado de (Schaeffer & Iadecola, 2021).

Las arterias, arteriolas, venas y vénulas acaban formando una intrincada red de capilares que son los que más directamente abastecen las necesidades de las células del cerebro. El cerebro se consideraba un órgano inmunoprivilegiado, aunque este paradigma ha cambiado en los últimos años y hoy día cada vez hay más evidencia que señala que el cerebro no se encuentra tan aislado del sistema inmune sistémico. Para mantener esta separación es esencial la barrera hematoencefálica, que cobra aún más importancia en los capilares. Estos se encuentran cubiertos por pericitos y estos a su vez por astrocitos, ambos rodeando las uniones estrechas del endotelio capilar y compartimentalizando así el contenido celular de los vasos cerebrales y el propio parénquima (Sweeney et al., 2019).

## 2.2 La unidad neurovascular

*Unidad neurovascular* es un término acuñado para subrayar la relevancia de la estrecha relación entre las células cerebrales y la microvasculatura, así como su íntima regulación coordinada para adaptarse a las necesidades del organismo. La unidad neurovascular la conforman las células endoteliales, las células musculares lisas, los macrófagos perivascuales, la matriz extracelular, las neuronas, los pericitos, los astrocitos y la microglía (Fig.4) (Iadecola, 2017).

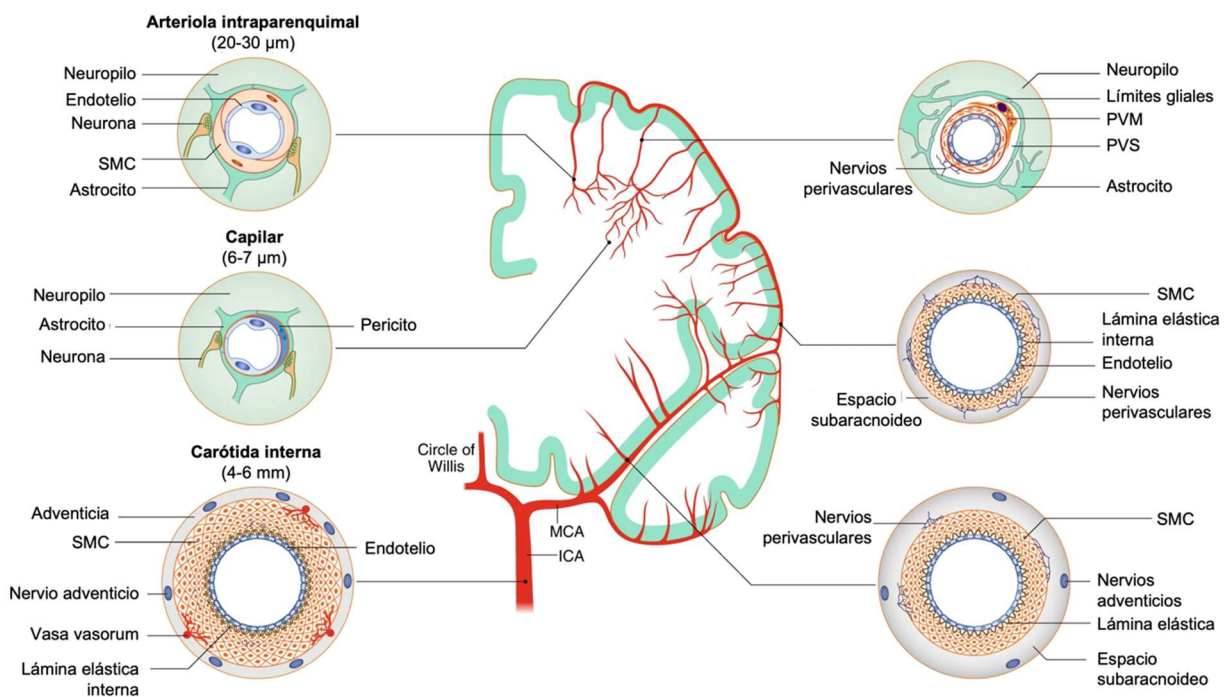


Fig. 4. Diversidad del complejo neurovascular. Diagrama actualizado de la unidad neurovascular. SMC: célula muscular lisa, PVM: macrófago perivascular, PVS: espacio perivascular. Adaptado de (Schaeffer & Iadecola, 2021).

El flujo sanguíneo cerebral debe ser controlado de forma precisa, dinámica y eficaz para asegurar la correcta perfusión de las diferentes regiones cerebrales según sus necesidades cambiantes y al margen de los cambios en la presión arterial. Esta autorregulación cerebrovascular recae principalmente en las células musculares lisas vasculares, que deben contraerse en respuesta al aumento de la presión transmural. Cuando la presión arterial aumenta, se produce vasoconstricción para mantener el flujo sanguíneo constante, mientras que una disminución en la presión arterial resulta en vasodilatación (Cipolla, 2009; Koller & Toth, 2012; Santisteban & Iadecola, 2018). Las células endoteliales también desempeñan un papel importante en la regulación del tono vascular al ser las encargadas de mediar la señalización que conduce a la relajación o contracción de las células musculares lisas. De este modo, es el endotelio el que libera señales vasoactivas, mediadores constrictores o relajantes, que regulan el tono de los vasos sanguíneos (Andresen et al., 2006). El óxido nítrico (NO) es uno de los factores más implicados en la vasodilatación (Hoiland et al., 2020). Lo producen las células endoteliales y, al ser un gas, puede difundir hasta el músculo liso vascular. La señalización del NO genera guanosín-monofosfato

cíclico (cGMP, del inglés *cyclic Guanosine MonoPhosphate*) que secuestra el calcio en el retículo y activa los canales de salida de potasio, la relajación de las fibras musculares y finalmente la vasodilatación (Carvajal et al., 2000; Kraehling & Sessa, 2017).

El acoplamiento neurovascular ("*neurovascular coupling*") es el mecanismo mediante el que el flujo sanguíneo local en el cerebro se regula dependiendo de la actividad neural para satisfacer las demandas energéticas y metabólicas (Faraco & Iadecola, 2013). En un proceso que involucra a neuronas, astrocitos y células vasculares en un esfuerzo concertado, se suplen las necesidades de oxígeno y glucosa y se eliminan los productos del metabolismo celular (Attwell et al., 2010; Faraco & Iadecola, 2013; Santisteban & Iadecola, 2018). Este acoplamiento neurovascular se logra mediante una respuesta local y una respuesta remota. La respuesta local involucra la liberación de moléculas señalizadoras vasoactivas, que afectan a los segmentos vasculares circundantes. Por otro lado, la respuesta remota se transmite de modo ascendente hacia las arterias mayores (Hoiland et al., 2020; Ma et al., 2016; Schaeffer & Iadecola, 2021). Esta capacidad de regulación remota, junto a la diversidad de componentes que integran la unidad neurovascular dependiendo del tipo de vaso del que se trate (desde grandes arterias hasta capilares), ha generado un nuevo término para reflejar más adecuadamente toda la complejidad de la unidad y el acoplamiento neurovascular: el *complejo neurovascular* (Schaeffer & Iadecola, 2021) (Fig. 4).

La perfusión cerebral adecuada es crucial para el correcto funcionamiento del cerebro (Duncombe et al., 2017). La reducción del flujo sanguíneo cerebral tiene efectos negativos en la función cognitiva. A medida que disminuye el flujo sanguíneo, se producen progresivamente eventos adversos, comenzando por una disminución en la capacidad de mantener la atención y en el rendimiento cognitivo, seguido de la inhibición de síntesis proteica, el cambio al metabolismo anaerobio y finalmente el colapso de la homeostasis celular, que lleva aparejada la muerte celular (Harris et al., 1981; Hossmann et al., 1994; Mies et al., 1991; Siesjö, 1992).

### **2.3 Mecanismos subyacentes al VCI**

La patología y los mecanismos subyacentes al VCI no están completamente descritos aún. La histopatología y los síntomas clínicos del VCI pueden variar según el origen y el tipo; igualmente, la región y el tamaño de la lesión juegan un papel muy relevante (Venkat et al., 2015).

Con todo, como se introducía en el epígrafe anterior, la correcta perfusión cerebral es crítica para el desempeño del cerebro, por lo que la hipoperfusión global crónica ha sido propuesta como uno de los desencadenantes más importantes del VCI. Se ha demostrado que la hipoperfusión crónica causa lesiones en la sustancia blanca, atrofia cerebral, hemorragia, infartos lacunares y deterioro cognitivo en roedores (Bink et al., 2013). Diversos estudios clínicos han mostrado, asimismo, una asociación entre la reducción del flujo sanguíneo cerebral y la enfermedad cerebral de pequeño vaso (cSVD, del inglés *cerebral Small Vessel Disease*) (Duncombe et al., 2017). Sin embargo, la reducción de flujo cerebral observada en los pacientes de VCI podría también ser un reflejo de la reducción en las demandas metabólicas asociadas a la hipoactividad neural, por lo que se necesitan más estudios para esclarecer si la hipoperfusión crónica juega un rol causal en la patología humana (Iadecola et al., 2019).

Por otro lado, el incremento de la pulsatilidad arterial ha surgido con fuerza recientemente como un factor contribuyente al desarrollo de VCI (Shi et al., 2020). La rigidez arterial ha sido poco estudiada en modelos animales, existiendo solo modelos de calcificación de las carótidas para el estudio de esta patología y su afectación cerebral. Sin embargo, sabemos que la rigidez arterial, que de forma fisiológica se produce por la pérdida de fibras elásticas y de las células musculares lisas, ocurre durante el envejecimiento (Jaminon et al., 2019), y limita la capacidad arterial de reducir la pulsatilidad originada por la contracción rítmica del corazón (Lacolley et al., 2017). Además de por el envejecimiento, este fenómeno se ve agravado por la hipertensión así como por otras patologías vasculares (Sehgel et al., 2015). Asimismo, la rigidez de las arterias cerebrales también tiene un papel en el incremento de la pulsatilidad intracraneal. Aunque la relación entre la pulsatilidad aumentada y el daño cerebral no está bien establecida, la evidencia existente apunta a una disfunción del acoplamiento neurovascular resultando en hipoperfusión asociada a incrementos de la actividad cerebral, estrés hidrodinámico, daño vascular y deposición acelerada de péptido  $\beta$ -amiloide (Iulita et al., 2018).

El daño y la disfunción endoteliales son otros de los principales efectos de los factores de riesgo cardiovascular, muy relacionados con el estrés hidrodinámico al que se someten los vasos sanguíneos. A su vez, esta disfunción puede repercutir en la autorregulación neurovascular (Fig. 5), la integridad de la barrera hematoencefálica, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) o la producción de NO (Faraco et al., 2018; Iadecola, 2017; Tarantini et al., 2017).

La barrera hematoencefálica (BHE) es una de las primeras perjudicadas en los modelos animales de enfermedad cerebrovascular como los de hipertensión, hipoperfusión global crónica o envejecimiento (Duncombe et al., 2017; Toth et al., 2017). En la clínica, la disfunción de la barrera se ha asociado a la enfermedad de pequeño vaso, a la demencia vascular y a la enfermedad de Alzheimer (Fig. 4) (Barry Erhardt et al., 2019; Nation et al., 2019). Dado el papel crítico que tiene la BHE en proteger al cerebro de los componentes sanguíneos potencialmente neurotóxicos (Strickland, 2018), su disfunción está relacionada con pérdida neuronal y degradación de la sustancia blanca (Toth et al., 2017). Del mismo modo, el ensanchamiento de los espacios perivasculares, una característica identitaria de la enfermedad de pequeño vaso, se relaciona con una limitada capacidad de aclaramiento de productos tóxicos del parénquima cerebral y con el fallo del sistema glinfático (Brown et al., 2018; Iadecola et al., 2019; Mestre et al., 2017).

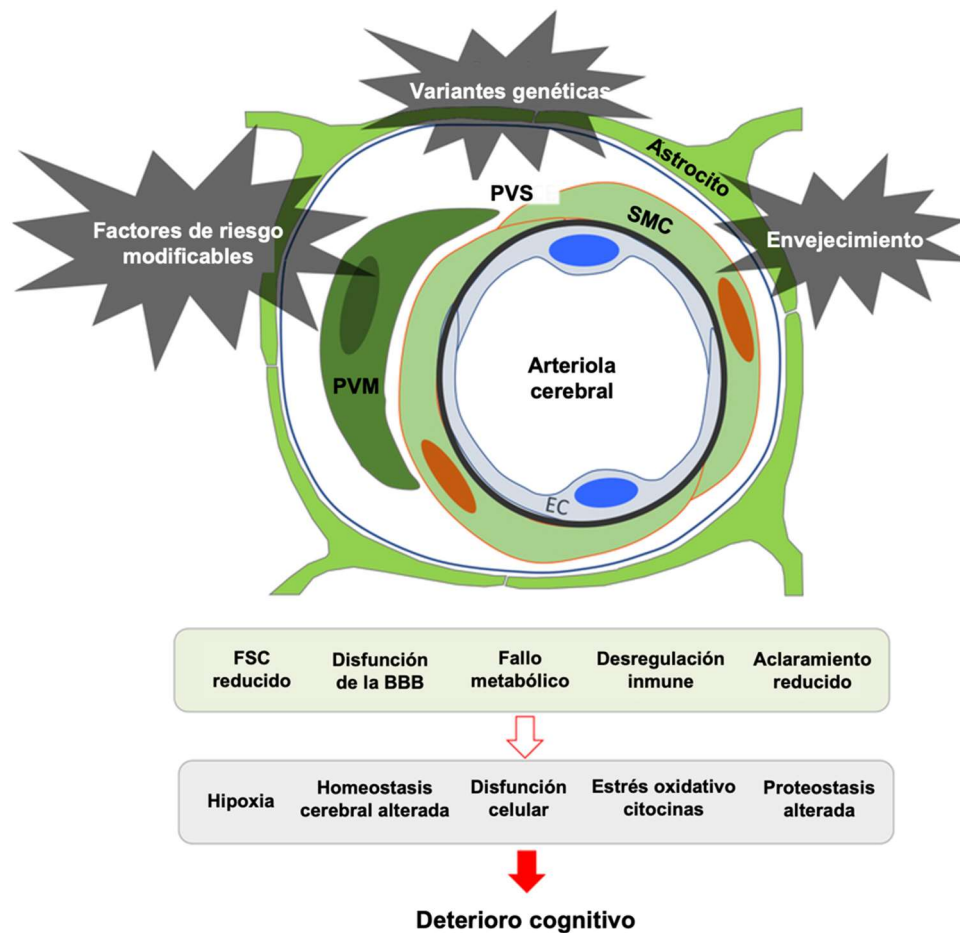


Fig. 5. Mecanismos fisiopatológicos subyacentes al VCI. Adaptado de (Iadecola et al., 2019).

### 2.3.1 Interacción de los mecanismos tisulares, celulares y moleculares

A pesar de que la hipoperfusión no pueda ser asumida como el factor inicial y causante del VCI, esa reducción del flujo sanguíneo cerebral, que puede ser originada por diversos factores, sí puede ser considerada como una de las fuerzas motoras de la disfunción vascular que conduce a deterioro cognitivo (Duncombe et al., 2017). La reducción de flujo se vincula íntimamente a la hipoxia, el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria (Fig. 5). El hipocampo, los ganglios basales y la sustancia blanca son especialmente susceptibles a estos eventos patológicos y el déficit cognitivo asociado a la disrupción de la señalización entre la corteza prefrontal y los ganglios basales es uno de los hitos característicos de la demencia vascular (Venkat et al., 2015).

El estrés oxidativo y la hipoxia conforman un círculo vicioso en el que ambos eventos perniciosos se retroalimentan. Así, el estrés oxidativo inducido por la hipoxia provoca disfunción mitocondrial y daño neuronal. Y a su vez, la hipoxia inducida por el estrés oxidativo también afecta a la función mitocondrial. Conjuntamente inducen apoptosis por la vía de la óxido nítrico sintasa (NOS) y liberación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres (Huang et al., 2007; Li et al., 2013; Ma et al., 2013).

El desequilibrio entre ROS y antioxidantes ocasionado por la hipoxia, el propio estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial generan un ambiente citotóxico que conduce al daño endotelial, glial y neuronal,

que a su vez provoca el fallo del acoplamiento neurovascular y una aún más limitada capacidad de autorregulación neurovascular, con la consiguiente incapacidad para adaptar el flujo sanguíneo cerebral a las necesidades neurales (Liu & Zhang, 2012).

Además, el daño vascular y endotelial conducen a la ruptura de la barrera hematoencefálica y contribuyen a exacerbar la inflamación; adicionalmente, la inflamación es uno de los mayores contribuyentes a la pérdida de integridad de la BHE. Así, las moléculas señalizadoras inflamatorias (como IL-1, IL-6, MMPs, TNF $\alpha$ , Proteína C reactiva) (Iemolo et al., 2009), que ven facilitado su paso con la ruptura de la BHE, incrementan el daño a la sustancia blanca, originan neurodegeneración y muerte celular, y contribuyen a la respuesta inmuno-glial (Chen et al., 2011; Iemolo et al., 2009). La glía, en relación con el sistema inmune, tiene un rol relevante en la inflamación cerebral y sus efectos perjudiciales. Particularmente, contribuye a incrementar las lesiones en la sustancia blanca y la desmielinización por el daño ejercido a los oligodendrocitos (Wang et al., 2010). El otro gran damnificado es el hipocampo, en su caso por su susceptibilidad al aporte de oxígeno y nutrientes correcto y a la inflamación (Venkat et al., 2015). Ambas afecciones amenazan la salud cognitiva, por un lado deteriorando la transmisión de señales y la conexión entre las distintas regiones cerebrales y, por el otro, afectando a la memoria, la separación de patrones y el aprendizaje (Park et al., 2010; Stranahan et al., 2008).

## **2.4 Estenosis bilateral de las arterias carótidas**

La aterosclerosis carotídea es una de las principales causas de hipoperfusión cerebral crónica; a menudo cursa de modo asintomático, de modo que la placa de ateroma puede crecer silenciosamente durante años. El riesgo de desarrollar aterosclerosis está significativamente aumentado en los pacientes con enfermedad vascular y factores de riesgo, como diabetes mellitus, hipertensión, hiperlipidemia y tabaquismo. No todos los pacientes con aterosclerosis carotídea tienen un mayor riesgo de ictus; sin embargo, existe una fuerte asociación entre la gravedad de la estenosis y el riesgo de ictus (Lamanna et al., 2019).

Para modelizar la aterosclerosis carotídea se desarrolló un modelo murino en el que se implantan dos *microcoils* alrededor de ambas carótidas restringiendo de este modo el flujo sanguíneo que transportan. Este modelo de estenosis bilateral de las arterias carótidas comunes (BCAS, del inglés *Bilateral common Carotid Stenosis*) ha sido, desde su descripción (Shibata et al., 2004), uno de los modelos murinos más utilizados para modelizar y mimetizar la hipoperfusión, la enfermedad de pequeño vaso y, en última instancia, el VCI. Entre los principales efectos de este modelo descritos desde sus primeros estudios se encuentra el daño a la sustancia blanca, la inflamación, la disrupción de la barrera hematoencefálica y el deterioro de la memoria espacial de trabajo y de referencia (Bink et al., 2013; Coltman et al., 2011; Duan et al., 2009; Miyamoto et al., 2013; Nishio et al., 2010; Shibata et al., 2007). El uso de este modelo ha permitido estudiar la hipoperfusión como mecanismo subyacente al VCI en el ratón y su implicación en los mecanismos que conducen al deterioro cognitivo.

El estudio de este modelo se ha centrado especialmente en sus efectos a corto plazo, un mes, existiendo solo algunos trabajos que hayan investigado los efectos a largo plazo, tres o más meses (Nishio et al.,

2010; Shibata et al., 2007). Asimismo, debido a sus rápidos efectos perjudiciales sobre la sustancia blanca, muchos estudios se han centrado en la misma (Coltman et al., 2011). En la última década especialmente se han publicado trabajos que exploran los efectos de la hipoperfusión inducida por BCAS en la sustancia gris y en estructuras subcorticales; a pesar de ello, solo unos pocos trabajos han explorado sus consecuencias sobre el hipocampo (Li et al., 2023; Liu et al., 2021; Stevenson et al., 2020), una región cerebral especialmente sensible a la hipoperfusión y, menos aún, sobre la neurogénesis (Higaki et al., 2018; Song et al., 2018). Este modelo será uno de los empleados en esta tesis doctoral para estudiar los mecanismos fisiopatológicos de la hipoperfusión y el VCI.

## 2.5 Enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo vascular

Como se ha expuesto anteriormente, la enfermedad de Alzheimer (EA) fue inicialmente descrita como una patología vascular; sin embargo, con el paso de las décadas y el descubrimiento de las placas de  $\beta$ -amiloide y de los ovillos neurofibrilares de Tau la investigación de los factores vasculares asociados cayó en el olvido. Este proceso se acompañó de una hegemonía de la EA haciéndola sinónimo de demencia, marginando y descartando la existencia de otros tipos de demencia. En las últimas décadas, además de descubrir la relevante incidencia y prevalencia de la demencia y el deterioro cognitivo vascular, se ha vuelto a poner en valor la contribución cardiovascular al desarrollo de la EA.

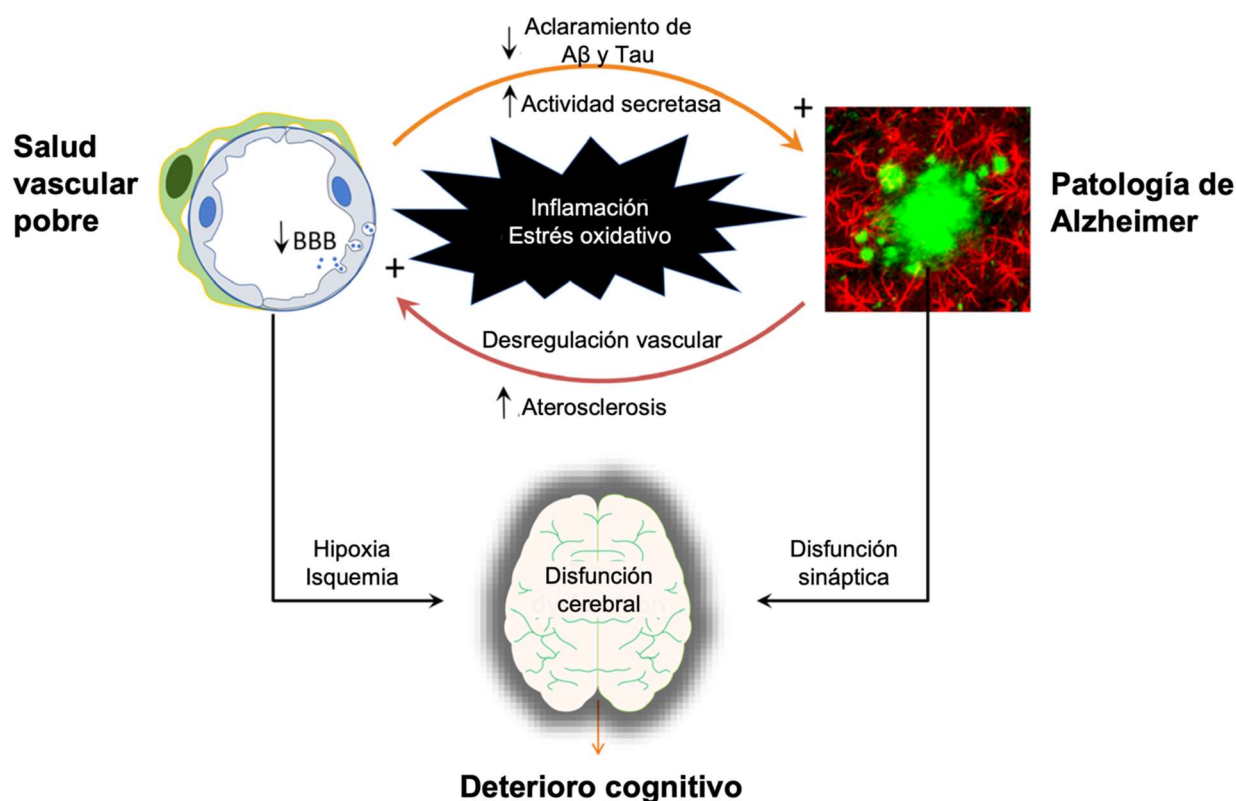


Fig. 6. Contribución de los factores vasculares a la demencia de Alzheimer. Adaptado de (Iadecola & Gottesman, 2019).

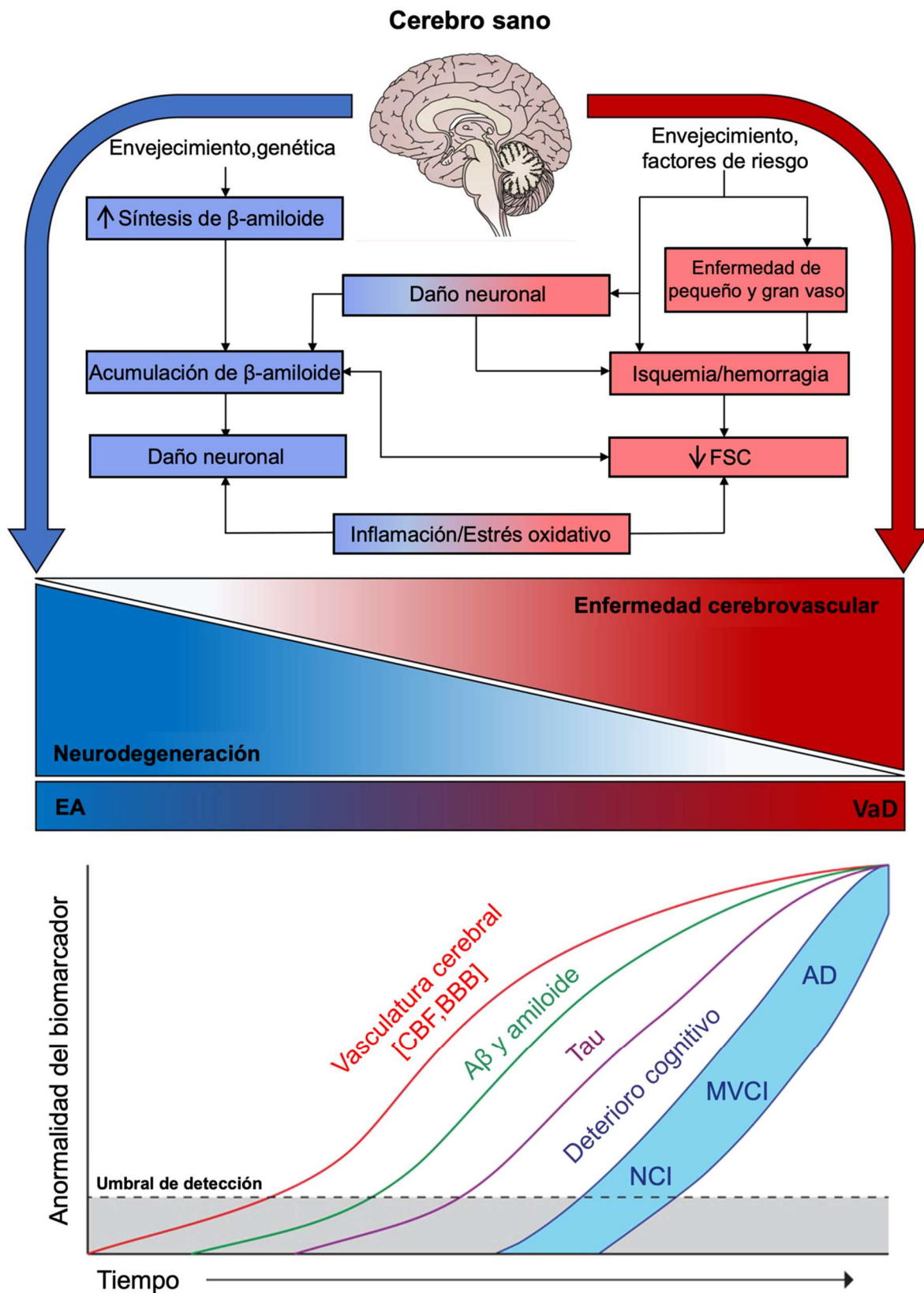


Fig. 7. Relación entre la demencia vascular y la enfermedad de Alzheimer. (A) Interconexión de los factores de riesgo y mecanismos para ambos orígenes de demencia. (B) Cronología en el desarrollo de EA. AD: enfermedad de Alzheimer, MVCI: deterioro cognitivo vascular leve, NCI: sin deterioro cognitivo, CFB: flujo sanguíneo cerebral, BBB: barrera hematoencefálica. Adaptado de (Fierini, 2020) y (Sweeney et al., 2018).

Las recientes revisiones en el campo de la EA han subrayado la presencia dominante de daños vasculares en los cerebros de pacientes de esta enfermedad, así como la fuerte asociación con factores de riesgo cardiovascular y su prevalencia (Fig. 6). Tanto es así que los pacientes de EA muestran una mayor carga aterosclerótica extracraneal (Azarpazhoooh et al., 2018; Dearborn et al., 2017). Sin embargo, a pesar de estas fuertes asociaciones, el origen de la demencia de Alzheimer sigue lejos de poder resolverse. Algunos estudios buscan determinar si las causas vasculares son las que conducen inicialmente al desarrollo de los principales hitos de la EA, placas de  $\beta$ -amiloide y ovillos neurofibrilares, o si, por el contrario, son estos los que conducen al daño vascular. Es conocido el efecto negativo que los depósitos de A $\beta$  tienen sobre el endotelio, la autorregulación neurovascular y la inflamación (Iadecola, 2004; Zhang et al., 1997), apoyando la hipótesis de que la contribución vascular sea secundaria. Sin embargo, por otra parte, en algunos estudios se han identificado daños vasculares extracraneales subclínicos que preceden al desarrollo de la EA (Fig. 7), aunque estos cambios podrían ser debidos a acumulaciones de A $\beta$  o P-TAU a niveles indetectables (Iadecola, 2017; Iturria-Medina et al., 2016). Un estudio de la *Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative* ha probado que la disfunción vascular podría ser el primer biomarcador de la patología, antes incluso que la detección de  $\beta$ -amiloide (Iturria-Medina et al., 2016; Sweeney et al., 2018).

### **3. Eje intestino-cerebro y el efecto del sodio en la dieta**

#### **3.1 El eje intestino-cerebro**

Desde hace una década se ha subrayado la relevancia de la interconexión de órganos, aparatos y sistemas que se creían aislados y estancos. De este modo, se ha potenciado el estudio de la interconexión entre el cerebro (considerado privilegiado por muchos siglos), el intestino y el sistema inmunológico hasta desarrollar el término, hoy ampliamente usado, de *eje intestino-cerebro-microbiota*. Este concepto pone de manifiesto la estrecha relación entre estos agentes, con la intervención también del sistema inmunitario. Este eje se establece ya en el desarrollo fetal y persiste a lo largo de la vida (Mayer et al., 2022).

Las vías de señalización más estudiadas y aceptadas hoy son: la comunicación nerviosa (principalmente por el nervio vago), la interconexión inmune y la circulación sistémica. Las tres rutas pueden jugar un papel bidireccional, de modo que el cerebro puede afectar al intestino y a la microbiota o, de forma inversa, la microbiota, el intestino o su interacción pueden provocar efectos cerebrales. Así, los metabolitos generados por la microbiota y endocitados por el intestino pueden alcanzar el SNC mediante la circulación sistémica y, por esta misma vía, los glucocorticoides y hormonas del eje hipofisario llegan al aparato gastrointestinal (AGI). Por su parte el nervio vago es capaz de transducir las señales cerebrales al AGI; de este modo, responde al estrés emocional, a la neuroinflamación y otras condiciones y, en sentido opuesto, el nervio vago mediante sus vías aferentes informa al cerebro de la presencia de mediadores inflamatorios en el AGI. Finalmente el sistema inmunológico, aunque ya participa de la comunicación

nerviosa y de la circulación sistémica, ejerce un papel propio fundamental, con una respuesta coordinada humoral y celular que es igualmente bidireccional (Agirman et al., 2021).

La permeabilidad del AGI junto a la composición del microbioma se han posicionado como factores clave a considerar cuando se estudian enfermedades del SNC (Evrensel & Ceylan, 2015). Se ha encontrado un papel del eje intestino-cerebro en patologías tan diversas como: trastornos psiquiátricos como el estrés, la ansiedad y la depresión (Bruce-Keller et al., 2015); el autismo (Kim et al., 2017); enfermedades neurodegenerativas como EA y enfermedad de Parkinson (Sampson et al., 2016); el ictus (Benakis et al., 2016); la obesidad (Asadi et al., 2022) o la esclerosis múltiple (Kadowaki & Quintana, 2020).

La dieta, por su parte, también desempeña un papel crucial en la regulación del eje y, de este modo, cobra una relevancia clave que se está empezando a estudiar en la función cognitiva y cerebral. Las dietas más investigadas han sido las altas en grasas, posiblemente por toda la literatura existente sobre su implicación en la patología cardiovascular y la obesidad. Por ello, se han realizado también numerosos estudios abordando el papel de estas dietas en el deterioro cognitivo (McLean et al., 2018), particularmente en la EA (Martins et al., 2017). Sin embargo, en los últimos años también se han comenzado a estudiar otras dietas como las dietas altas en sodio y estilos dietarios como la dieta mediterránea (Solfrizzi & Panza, 2014).

### **3.2 Consumo de dietas altas en sodio**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la reducción en la ingesta de sal es una de las medidas más costo-eficaces para mejorar la salud de la población. El consumo de sal (por el sodio que contiene) puede ser considerado hoy día una epidemia en la medida en que 2,5 millones de defunciones se podrían evitar si el consumo de sal se redujera a los niveles recomendados. La OMS recomienda un consumo máximo de sal de 5 g (aproximadamente 2 g de Na); sin embargo, el promedio mundial oscila entre 9 y 12 g al día, más del doble de lo recomendado. Diversos estudios, según la OMS, han puesto de manifiesto que un consumo de sodio acorde a las recomendaciones disminuye la presión arterial, el riesgo de enfermedad cardiovascular, de ictus y de infarto de miocardio.

El sodio es un micronutriente esencial para la supervivencia y buen funcionamiento del organismo; no obstante, sus niveles deben ser estrictamente regulados para el mantenimiento de la homeostasis. El exceso de sodio causa retención de líquidos, una expansión del volumen sanguíneo, edema y elevación de la presión arterial (Graudal et al., 2014). La hipertensión arterial es uno de los factores de riesgo cardiovascular más frecuentes y perjudiciales. Además, en los últimos años se ha relacionado estrechamente con el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento y el deterioro cognitivo vascular (Iadecola & Gottesman, 2019). Adicionalmente a esos efectos, también se ha observado que la hipernatremia se relaciona con mayor riesgo de osteoporosis, cálculos renales y enfermedad gastrointestinal. Por otro lado, la deficiencia de sodio ocasiona debilidad, irritabilidad, confusión y calambres musculares (Graudal et al., 2014). Todo esto hace esencial el adecuado control sobre la ingesta del sodio, que es tan necesario como puede llegar a ser perjudicial en exceso.

Además de los efectos mediados por la hipertensión arterial, e independientemente de ellos, el consumo excesivo de sal se ha vinculado a un mayor riesgo de enfermedad cerebrovascular y demencia. Uno de los factores implicados ha sido la rigidez arterial (Baldo et al., 2019; Brady et al., 2022), la cuál es considerada un factor de riesgo para el VCI y el ictus.

Asimismo, recientemente se ha descrito un mecanismo por el que el consumo excesivo de sodio induce VCI vinculado a la hipoperfusión crónica. Estos autores describen un paradigmático ejemplo del eje intestino-cerebro en el que el exceso de sodio en la dieta provoca una expansión de células  $\gamma\delta$  en el intestino y linfocitos TH17. Ambas poblaciones secretan interleucina IL-17A que viaja sistémicamente a los vasos sanguíneos cerebrales, donde interacciona con las células endoteliales provocando una hiperactivación de las quinasas ROCK que al fosforilar a la NO sintasa endotelial (eNOS, del inglés *endothelial nitric oxide synthase*) limita la producción de NO y con ello causa un descenso del flujo sanguíneo cerebral tanto en reposo como en respuesta a acetilcolina. En este mismo modelo describen un deterioro cognitivo (Fig. 8) asociado a la memoria de reconocimiento (estudiada por la prueba de reconocimiento de nuevo objeto) (Faraco et al., 2018). Además, el deterioro cognitivo es dependiente del incremento de la fosforilación de TAU que es consecuencia de la hipoperfusión inducida por el exceso de sodio (Faraco et al., 2019).

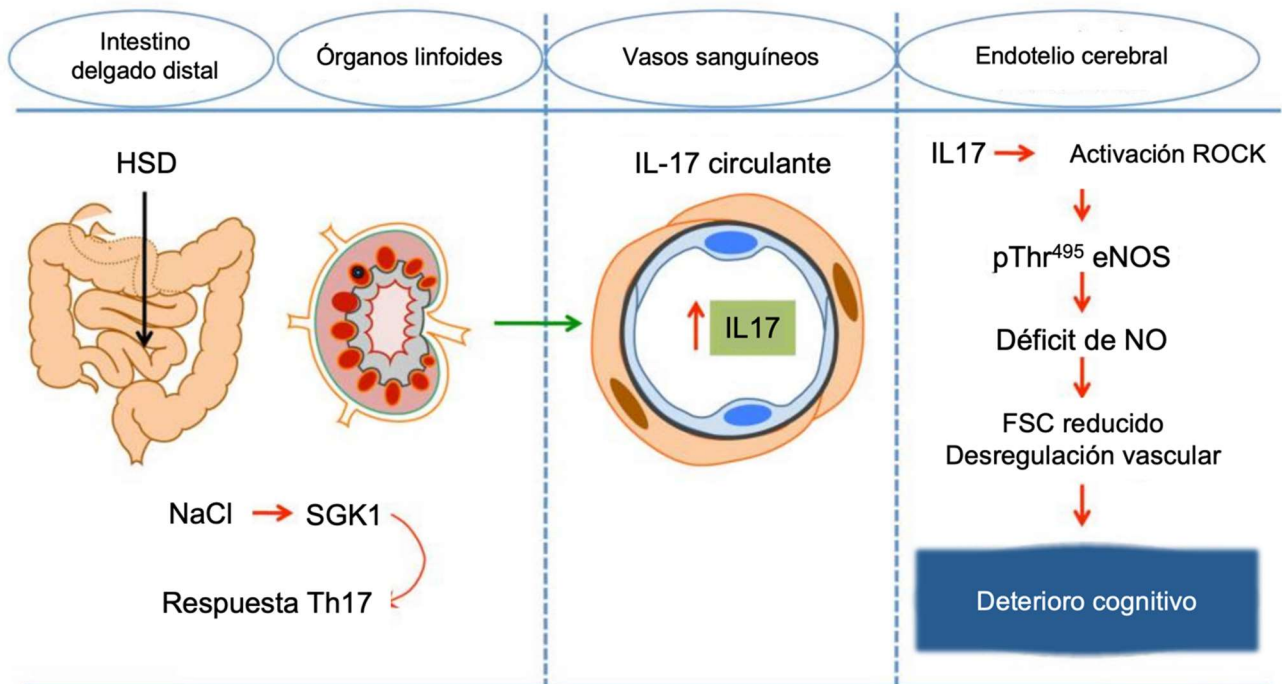


Fig. 8. Efecto de una dieta alta en sodio sobre la expansión de linfocitos Th17, la hipoperfusión global y el deterioro cognitivo. (Faraco et al., 2018)

## 4. El hipocampo

El hipocampo es una estructura cerebral que pertenece al sistema límbico y está ubicada en el lóbulo temporal. Su forma, semejante a un caballito de mar en algunas especies como la humana, es la que le da su nombre. Se encuentra conservado en los vertebrados y su pertenencia al sistema límbico nos habla de sus cambios funcionales a lo largo de la evolución: así, se cree que surgió como una estructura asociada al olfato; sin embargo, hoy día, en los mamíferos es esencial para el aprendizaje y la memoria.

Como se ha mencionado anteriormente, el hipocampo es una región particularmente sensible al flujo sanguíneo cerebral y su regulación (Venkat et al., 2015). En el ratón, está irrigado principalmente por las ramificaciones dorsales de la arteria coroidea anterior y la arteria hipocampal longitudinal (procedente de la arteria cerebral posterior) y por sus ramificaciones, las arterias hipocampales transversas (Dorr et al., 2007). El hipocampo es además una región muy particular porque es una de las dos regiones del cerebro adulto en la que la neurogénesis continúa a lo largo de toda la vida.

### 4.1 Estructura

El hipocampo está compuesto de dos estructuras principales: el *cornu ammonis* (CA) y el giro dentado. El *cornu ammonis* se encuentra a su vez subdividido longitudinalmente en 4 zonas nombradas según la numeración CA1, CA2, CA3 y CA4 (Tatu & Vuillier, 2014), y está organizado en capas o estratos: la capa piramidal o *stratum pyramidale* contiene los somas celulares de las neuronas piramidales, las principales neuronas excitatorias del CA y se reconoce por la acumulación de núcleos celulares que posee; el *stratum oriens* es la capa más externa del CA y contiene principalmente neuronas inhibitorias (células en cesta), las células trilaminares horizontales y las dendritas basales de las neuronas piramidales; el *stratum radiatum* contiene las fibras colaterales de Schaeffer, que son las proyecciones de las células piramidales, y también se observan algunas interneuronas y axones que lo atraviesan; el *stratum lacunosum* está formado tanto por fibras colaterales de Schaeffer como por fibras de la vía perforante (Fig. 9A) (DeFelipe et al., 2013; Wheeler et al., 2015).

El giro dentado está compuesto por una capa de somas de neuronas granulares denominada capa granular (CG), la capa molecular (CM), donde las neuronas granulares extienden sus dendritas y llegan los axones de la corteza entorrinal (CE) por la vía perforante, y el hilus o capa polimórfica compuesta por interneuronas y los axones de las neuronas granulares en su camino hacia CA3. (Fig. 9A) Además, la que fue nombrada como CA4 es en realidad una compactación de neuronas propias de la capa polimórfica, por lo que, según los autores, es o no considerada como una subdivisión del *cornu ammonis* (Amaral et al., 2007; Wheeler et al., 2015).

En el hilus se encuentran dos principales tipos de neuronas: las células en cesto, que son neuronas inhibitorias gabaérgicas y regulan la transmisión sináptica de las células granulares y las células musgosas, neuronas de proyección que son excitatorias y están implicadas en la conexión interhemisférica hipocampal (Mott et al., 1997; Sanchez-Aguilera et al., 2021; Wheeler et al., 2015).

La capa granular está formada principalmente por neuronas granulares, neuronas excitatorias glutamatérgicas, de soma pequeño y redondeado. Extienden su árbol dendrítico por la capa molecular y sus axones, conocidos como fibras musgosas, se proyectan hasta hacer sinapsis en CA3 con las neuronas piramidales. Además, la primera capa de células de la capa granular recibe el nombre de zona subgranular (SGZ, del inglés *subgranular zone*) y aloja a las células progenitoras encargadas de mantener la neurogénesis hipocampal adulta a lo largo de la vida del individuo (Fig. 10) (Sanchez-Aguilera et al., 2021; Wheeler et al., 2015; White et al., 2020).

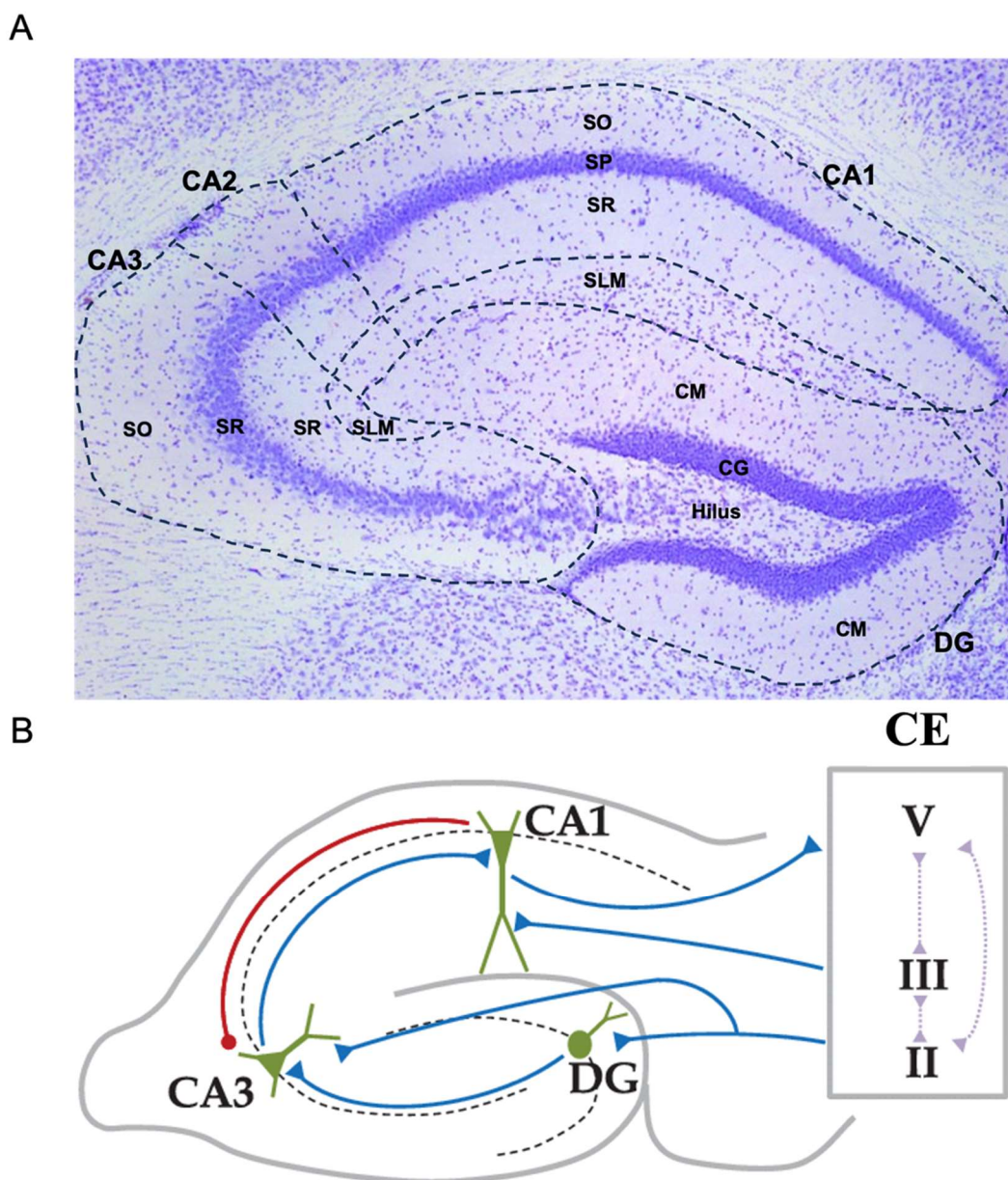


Fig.9. Representación del hipocampo, su anatomía y los circuitos que lo integran. (A) Imagen de la tinción de Nissl de un hipocampo mostrando las diferentes estructuras que lo conforman: SP: stratum pyramidale, SR: stratum radiatum, SO: stratum oriens, SLM: stratum lacunosum, CG: capa granular, CM:capa molecular. (B) Representación esquemática de las vías aferentes y eferentes que integra el hipocampo en relación con la corteza entorrinal. CE: Corteza entorrinal. Adaptado de (López-Madróna et al., 2017).

## 4.2 Circuitos y función hipocampal

Las vías aferentes de señalización que llegan al hipocampo proceden de la CE y lo hacen por la vía perforante (Fig. 9B). Estos axones se dirigen a la capa molecular, donde establecen sinapsis con las dendritas de las células granulares que a su vez conectan a través de las fibras musgosas con las dendritas de las células piramidales de CA3. Estas neuronas emiten axones conocidos como colaterales de Schaffer que se dirigen al *stratum radiatum* de CA1 donde conectan y crean sinapsis con las dendritas basales de las células piramidales de CA1, que a su vez proyectan axones hacia el subículo y de regreso a las capas profundas de la corteza entorrinal (Fig. 9B). Además de este circuito, relativamente sencillo y directo, hay muchas vías paralelas que interconectan todas estas neuronas. De este modo, una parte de las aferencias de la EC viajan directamente hasta las neuronas piramidales de CA1 y CA3. También CA1 recibe aferencias comisurales del hipocampo contralateral, mostrando la complejidad de la circuitería hipocampal y la alta capacidad del hipocampo para generar vías de señalización con las que procesar y almacenar la información (Sanchez-Aguilera et al., 2021; Tecuatl et al., 2021).

El hipocampo tiene un relevante papel en las funciones de aprendizaje y memoria. Cabe destacar que no se tiene un conocimiento preciso y delimitado de las funciones concretas de cada región cerebral ni de en qué región o regiones se sustenta cada función cognitiva. Sin embargo, existe una evidencia científica fehaciente de la implicación del hipocampo en el aprendizaje, la memoria y la navegación espacial, sin que pueda descartarse la participación de otras estructuras o que sus funciones se vean limitadas a estas.

El *aprendizaje* puede definirse como el proceso mediante el cual se adquiere una representación interna de una realidad. La *memoria* consiste en el almacenamiento de esa representación interna a lo largo del tiempo, y consta de 3 fases: adquisición o codificación, consolidación y recuperación o recuerdo. La memoria se clasifica según la duración de la representación interna en *memoria inmediata* (dura fracciones de segundo), la *memoria de trabajo* (se conserva durante segundos o minutos) y *memoria a largo plazo* (muy variable en el tiempo, pero superior a horas). Dentro de la memoria a largo plazo distinguimos entre *memoria declarativa o explícita* y la *memoria implícita*. La primera, que se relaciona con la información que retenemos explícitamente y que puede ser transmitida y enseñada, a su vez se clasifica en *memoria episódica*, las propias experiencias personales, y *memoria semántica*, que almacena el conocimiento de hechos generales que no corresponden con experiencias personales. La memoria implícita o procedimental hace referencia al recuerdo de habilidades ejecutivas o motoras que son inconscientes y que por tanto no pueden ser transmitidas (Harvey, 2019).

De todas las clases de memoria, el hipocampo se encuentra particularmente relacionado con la memoria a largo plazo declarativa episódica y, particularmente por su implicación en la orientación espacial, en la memoria episódica espacial (Hunsaker & Kesner, 2013; Toda & Gage, 2018).

En la codificación de la memoria, el hipocampo juega un papel fundamental. Para ello, tras la llegada de información por las vías aferentes al giro dentado, las neuronas granulares deben generar un patrón de codificación particular al realizar sinapsis con las células piramidales de CA3. Este patrón único de codificación es lo que permite diferenciar estímulos, imágenes o representaciones internas similares en

un proceso conocido como *separación de patrones*. Para su adecuado funcionamiento se cree que la neurogénesis tiene un rol clave, ya que son las nuevas neuronas, por sus características de excitabilidad, las que se involucran más directamente en este proceso. De este modo es posible diferenciar entre estímulos similares si estos han sido correctamente codificados mediante patrones sinápticos diferentes. La fase de *consolidación* del recuerdo o memoria requiere que la codificación del recuerdo se almacene de forma más estable, para lo que se cree que es fundamental la participación de diversas zonas de la corteza, sin que el hipocampo sea ajeno. No obstante, este proceso está mucho menos estudiado y se desconoce exactamente cómo se produce. Finalmente, durante la *fase de recuerdo*, aún más desconocida, se accede a la codificación almacenada en el pasado en un proceso en el que podrían converger multitud de estructuras cerebrales dependiendo del tipo de recuerdo del que se trate (Hunsaker & Kesner, 2013; Sanchez-Aguilera et al., 2021; Tecuatl et al., 2021).

### 4.3 Neurogénesis hipocampal adulta

Durante muchos años, la comunidad científica avaló el dogma de la incapacidad del cerebro adulto para generar nuevas neuronas. Sin embargo, ya durante el siglo XX comenzaron a aparecer evidencias que ponían en duda una teoría totalmente extendida y aceptada. Los experimentos de Joseph Altman fueron los primeros en señalar, por medio de la capacidad del giro dentado de ratas adultas de incorporar timidina tritiada (Altman & Das, 1965), que la neurogénesis adulta no fuera, tal vez, un imposible. A pesar de estos experimentos y de la relativamente sencilla aceptación de la existencia de neurogénesis adulta en el hipocampo y en la zona subventricular de los roedores (a partir de la década de los 80), todo el final del siglo XX y los comienzos del XXI no han estado exentos de controversia y discrepancia acerca de la neurogénesis adulta en el *Homo sapiens* (Boldrini et al., 2018; Sorrells et al., 2018). Aunque quizá pueda considerarse una cuestión no completamente resuelta, cada vez más evidencias señalan y avalan la generación de nuevas neuronas no solo en roedores sino también en primates y el en ser humano durante la edad adulta (Moreno-Jiménez et al., 2019; Tobin et al., 2019).

#### 4.3.1 Cascada neurogénica

En el ratón, la neurogénesis hipocampal adulta (AHN, del inglés *adult hippocampal neurogenesis*) es iniciada por un conjunto de células madre multipotentes conocidas como *radial glia-like* (RGL) o células progenitoras neurales quiescentes (QNP, del inglés *quiescent neural progenitors*) (Bonaguidi et al., 2011) y que conforman el conocido como *nicho neurogénico hipocampal* (Fig. 10) (Kempermann et al., 2004; Ming & Song, 2005). Las QNP tienen la capacidad de generar nuevas neuronas granulares así como astrocitos. Aunque aún en estudio, parecen tener tres posibles estadios: quiescentes, activadas y *primed* (Belenguer et al., 2021; Llorens-Bobadilla et al., 2015), aunque muchos autores solo mencionan el estadio activo y quiescente. El *estado quiescente* es en el que se encuentran la mayoría de QNP a lo largo de su vida y solo pasan al *estado activo* mediante un estímulo que induce la proliferación o diferenciación de estas células madre (Encinas et al., 2011). Existe, asimismo, controversia acerca del modelo de división y la capacidad de estas células para regenerarse indefinidamente o volver al estado quiescente una vez

activadas (Bonaguidi et al., 2012). Siendo este un aspecto aún por dilucidar en el campo, ya puedan mantener su capacidad de división permanentemente (en condiciones fisiológicas) y puedan o no volver al estado quiescente una vez activadas, sobre lo que sí existe un consenso es sobre su capacidad para generar los conocidos como progenitores neurales amplificadores (ANP, del inglés *amplifying neural progenitors*) o también como células madre neurales (NSC, del inglés *neural stem cells*) de tipo II (Fig. 10).

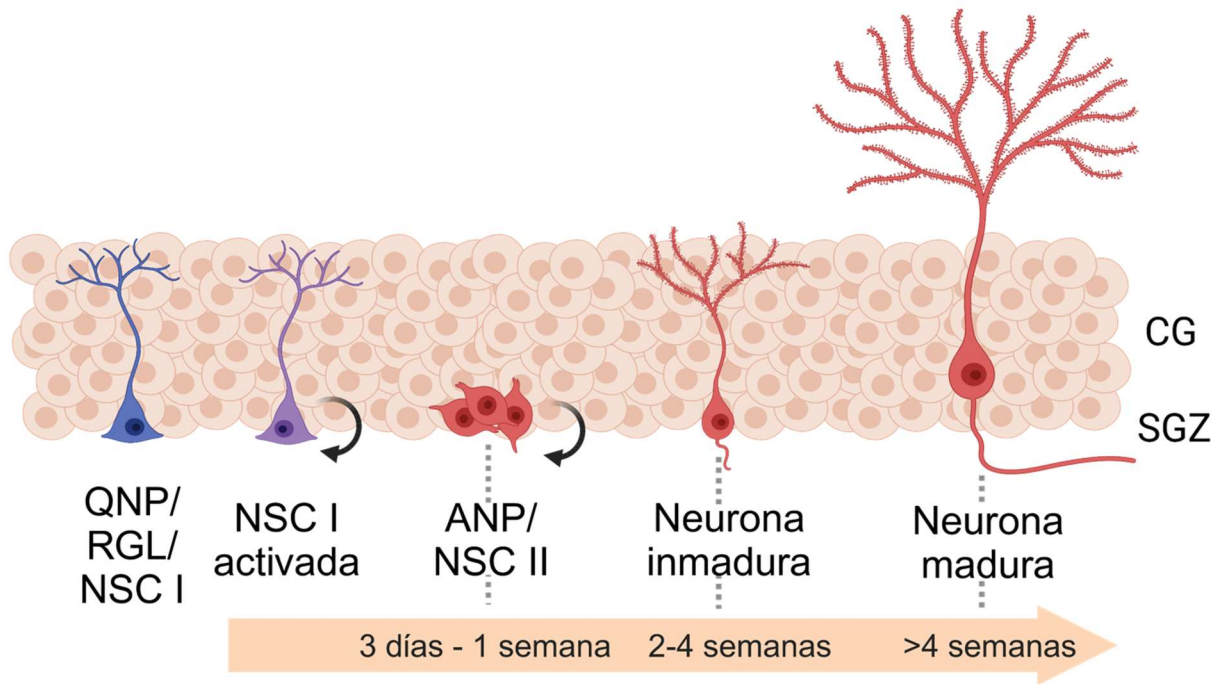


Fig. 10. Representación del nicho neurogénico hipocampal adulto mostrando las distintas fases de proliferación.

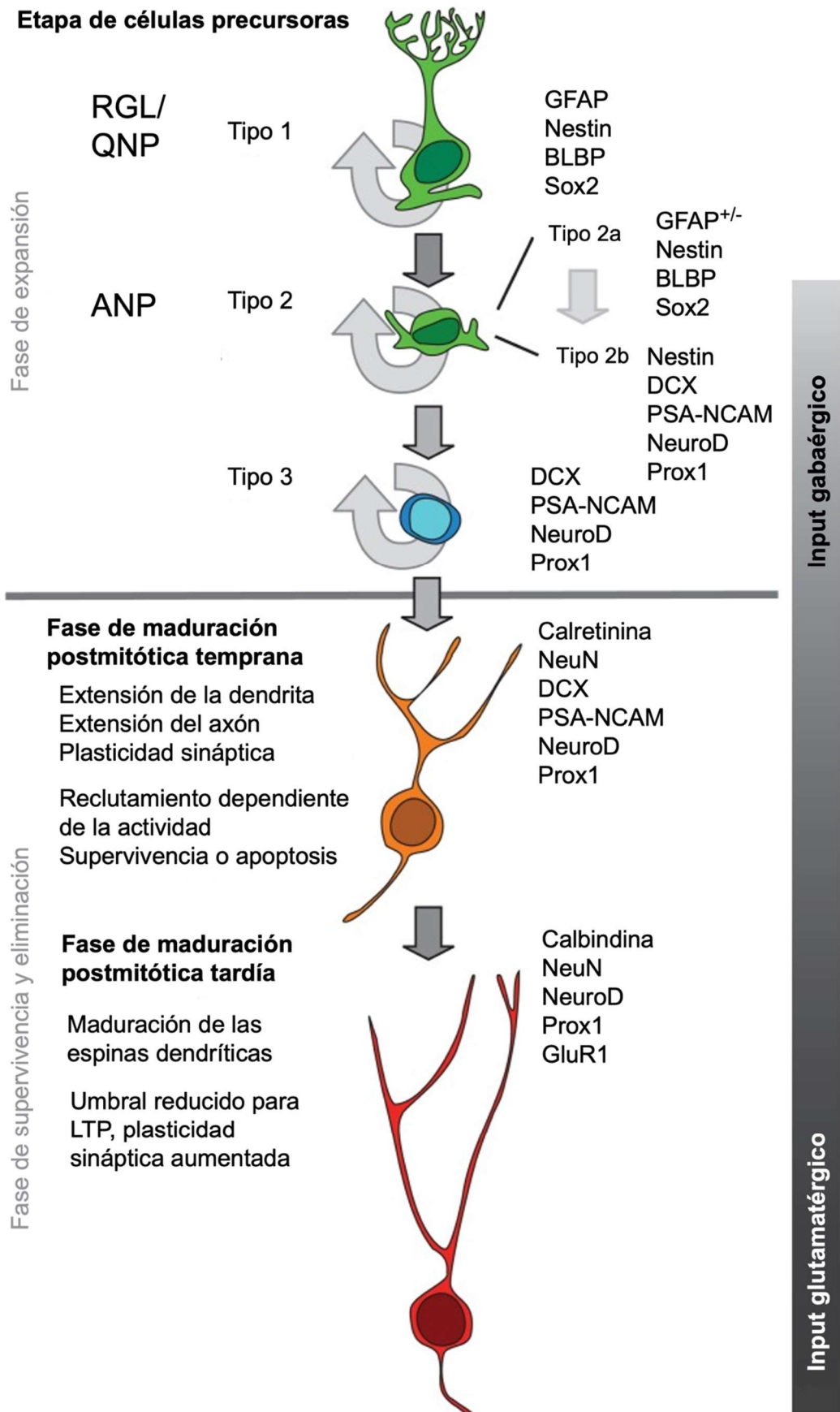


Fig. 11. Diferenciación y maduración de las células del nicho neurogénico hipocampal adulto con los marcadores típicos de cada estadio. Adaptado de (Kempermann et al., 2015).

Estas segundas células se dividen amplificando el número de células generadas por las QNP y a su vez acometen un proceso de maduración en el que pierden las características celulares (forma triangular con proyecciones en la capa molecular) y moleculares (expresión de GFAP, NESTINA, SOX2, etc.) propias de las RGL y adquieren marcadores propios de neurona como (PSA-NCAM, PROX1 o NEUROD) (Fig. 11). Durante el proceso expresan también marcadores propios de las etapas madurativas intermedias como DCX, que pierden en las etapas finales del proceso de maduración hacia neuronas granulares (Fig. 11). Por tanto, las ANP o NSC tipo II generadas mediante la división de las QNP sufren una serie de divisiones simétricas y emprenden un proceso de maduración hasta llegar a ser las conocidas como NSC tipo III, neuroblastos o neuronas granulares inmaduras (Fig. 10 y 11). Estas células han perdido casi por completo su capacidad de división, expresan aún el marcador DCX, pero todavía no expresan marcadores propios de neuronas granulares maduras como NeuN o calretinina (Fig. 11).

El proceso para la maduración de las recién formadas neuronas granulares y su integración en los circuitos hipocampales lleva aparejada la muerte celular programada de muchas de estas nuevas neuronas ya que, tras dos semanas, solo un bajo porcentaje acaban por integrarse en la circuitería. También conlleva el desarrollo del árbol dendrítico y del axón (Fig.10) que comunicará con las neuronas piramidales de CA3, y la expresión de los marcadores propios de neuronas granulares maduras como calbindina y de receptores de glutamato como GluR1 (Fig. 11), esenciales para su función en la transmisión de señales excitatorias glutamatérgicas (Cuartero et al., 2019).

# Hipótesis y objetivos

## Hipótesis

Los diferentes trastornos neurovasculares pueden desencadenar distintos grados de afectación del hipocampo, desencadenando problemas cognitivos de diversa naturaleza y severidad. Se sabe que el ictus produce deterioro cognitivo hipocampo-dependiente debido a alteraciones de la neurogénesis en el giro dentado en los ratones. Asimismo, los modelos de deterioro cognitivo vascular provocan alteraciones cognitivas; sin embargo, los mecanismos implicados en la generación del déficit cognitivo, la participación del nicho neurogénico y de otros factores concomitantes es poco conocida en estos modelos. Por tanto, hipotetizamos que el VCI puede originarse como consecuencia de una alteración de la neurogénesis hipocampal, por lo que proponemos que el VCI experimental en los modelos BCAS y HSD causarían un deterioro cognitivo hipocampo-dependiente relacionado con alteraciones de la dinámica de división, diferenciación y maduración del nicho neurogénico, pudiendo desembocar en signos histopatológicos tradicionalmente asociados a la EA.

## Objetivos

### Objetivo general

Estudio de la neurogénesis hipocampal adulta y sus capacidades cognitivas asociadas en dos modelos de deterioro cognitivo vascular: la estenosis bilateral de las arterias carótidas (BCAS) y la dieta alta en sodio (HSD).

### **1. Estudio del efecto de la hipoperfusión cerebral crónica mediante un modelo de estenosis bilateral de las arterias carótidas**

#### 1.1. Caracterización del modelo murino de BCAS

- 1.1.1. Evaluación del flujo sanguíneo cerebral
- 1.1.2. Evaluación de las características volumétricas del hipocampo
- 1.1.3. Evaluación del estado inflamatorio

#### 1.2. Estudio del efecto de la hipoperfusión cerebral crónica inducida por BCAS sobre la función cognitiva

#### 1.3. Estudio del efecto de la hipoperfusión cerebral crónica inducida por BCAS sobre la neurogénesis y la dinámica del nicho neurogénico hipocampales

- 1.3.1. Evaluación de la generación de nuevas neuronas granulares en el giro dentado
- 1.3.2. Evaluación de la apoptosis hipocampal
- 1.3.3. Evaluación de la proliferación de los neuroblastos hipocampales

## 1.4 Estudio de la implicación de los signos histopatológicos típicos de la EA en los efectos de la hipoperfusión cerebral crónica inducida por BCAS

1.4.1. Evaluación de la fosforilación de TAU

1.4.2. Evaluación de la hipoperfusión crónica como factor coadyuvante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

## **2. Estudio del efecto del consumo elevado de sodio en la dieta sobre la función cognitiva y la homeostasis hipocampal**

### 2.1. Caracterización del modelo murino de dieta alta en sal

2.1.1. Evaluación de la presión arterial

2.1.2. Evaluación de la perfusión cerebral

2.1.3. Evaluación de los parámetros hematológicos y bioquímicos

2.1.4. Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

### 2.2. Estudio del efecto de la HSD sobre la función cognitiva

2.2.1. Evaluación de la memoria episódica y espacial de trabajo tras 5 semanas de HSD

2.2.2. Evaluación de la memoria episódica y de reconocimiento tras 10-12 semanas de HSD

### 2.3. Estudio del efecto de la HSD sobre la neurogénesis hipocampal adulta

### 2.4. Estudio del efecto de la HSD sobre la regulación y dinámica del nicho neurogénico hipocampal

2.4.1. Evaluación de los cambios del nicho neurogénico anteriores a los cambios observados en el número de nuevas neuronas granulares

2.4.2. Evaluación de los cambios del nicho neurogénico simultáneos a las alteraciones en los neuroblastos

2.4.3. Evaluación de los cambios del nicho neurogénico hipocampal a largo plazo

# Materiales y métodos

## 1. Normativa de experimentación con animales

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las pautas del Comité de Bienestar Animal del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), el Comité de Bienestar Animal de la Universidad Complutense de Madrid y la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid (RD 53/2013; PROEX 047/16, PROEX 193.1/21), siguiendo las directivas europeas 86/609/CEE y 2010/63/UE.

Todos los experimentos se realizaron en ratones macho C57BL/6OlaHSD, alojados en jaulas ventiladas a 22°C bajo un fotoperíodo de 12 hora y 12 horas de oscuridad, con acceso *ad libitum* a agua y alimento.

## 2. Modelos animales utilizados

### 2.1 Modelo de estenosis bilateral de las arterias carótidas (BCAS)

Este modelo se viene utilizando por la comunidad científica para producir hipoperfusión cerebral crónica desde que fue propuesto por Shibata y colaboradores en 2004. Los ratones, de entre 7 y 10 semanas de edad, se asignaron al azar al grupo de simulación (también conocido del inglés como *sham*) o al grupo de estenosis bilateral de las arterias carótidas comunes (BCAS, del inglés *Bilateral Carotid Artery Stenosis*). La BCAS se indujo utilizando *microcoils* externos de 0,18 mm de diámetro interno, 2,5 mm de longitud total y 0,082 mm de grosor, como se describe previamente (Shibata et al., 2004). De este modo, al implantarlos alrededor de las arterias carótidas, se reduce su luz y por tanto el flujo sanguíneo que conducen hacia el cerebro.

En resumen, el procedimiento fue como sigue: los ratones fueron anestesiados y mantenidos con 3,5-4% de sevoflurano en una mezcla de 0,2/0,8 L/min de O<sub>2</sub>/aire, y la temperatura se mantuvo entre 36,5 y 37,5°C mediante una manta térmica. A través de una incisión cervical en la línea media, se expuso la arteria carótida común izquierda y se liberó de su vaina. La arteria se levantó suavemente con la ayuda de un hilo de seda 6-0 y se enrolló un *microcoil* de 0,18 mm alrededor de la arteria. Después de 30 minutos, se realizó el mismo procedimiento en la arteria carótida común derecha. Los animales del grupo de simulación se sometieron al mismo procedimiento sin implantar los *microcoils* (Fig.12). Al final de la cirugía, previamente a despertar, al animal se le inyectó 0,2 mg/kg de buprenorfina por vía subcutánea. Además, se complementa el agua de bebida con paracetamol (2 mg/mL). Conjuntamente, estas dos estrategias buscan mejorar el bienestar animal y reducir el dolor postoperatorio.

### 2.2 Modelo de dieta alta en sodio (HSD)

Para estudiar los efectos del consumo elevado de sal en la dieta, los animales se asignaron aleatoriamente a una dieta normal (ND, del inglés *Normal Diet*) (S9167-E210 Ssniff, 0,4% NaCl) o a una

dieta alta en sodio (HSD, del inglés *High-Sodium Diet*) (E15431-347, Ssniff, 4% NaCl). Los animales se mantuvieron en sus correspondientes dietas el tiempo que durase el experimento: 5, 10, 12 o 25 semanas.

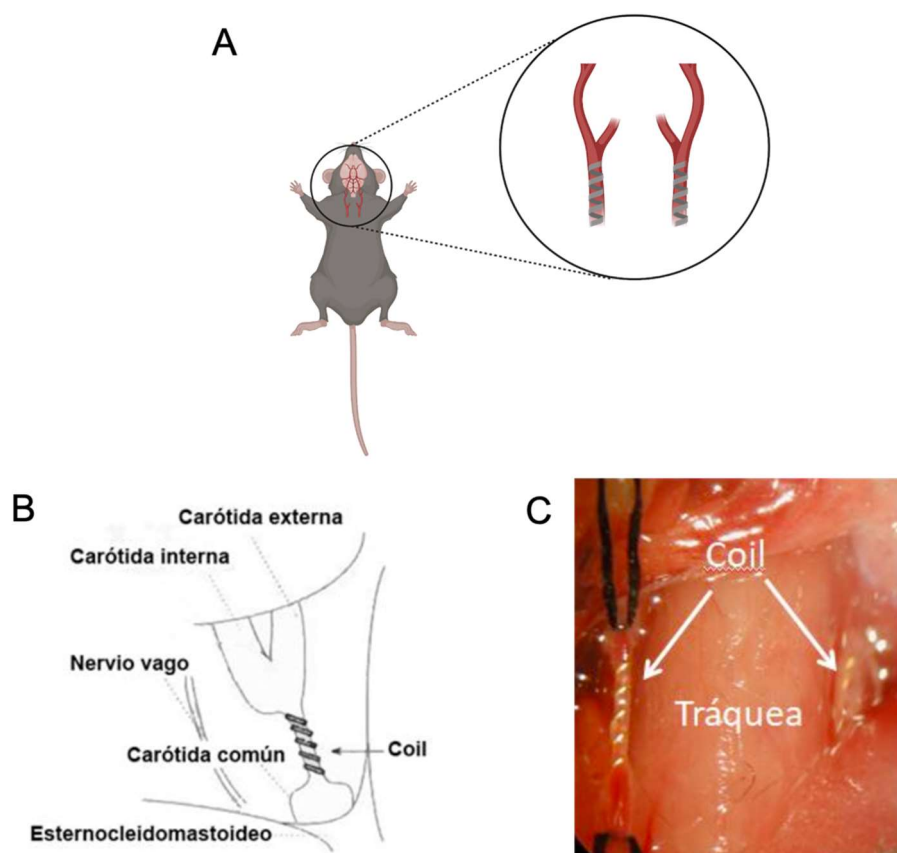


Fig. 12. Esquema de la cirugía BCAS. (A) Imagen mostrando la disposición de los microcoils tras la cirugía. (B) Esquema de la implantación del coil en la carótida con el entorno anatómico. (C) Imagen real de los microcoils una vez implantados. (B y C) Adaptados de Shibata et al. 2004.

### 2.3 Modelo de la enfermedad de Alzheimer (APP<sup>NL-F</sup>)

El modelo de la enfermedad de Alzheimer utilizado ha sido el ratón transgénico *knock-in* APP<sup>NL-F</sup>, cedido por los investigadores Takashi Saito y Takaomi Saido del RIKEN Brain Science Institute, Wako-shi, Saitama, Japón. Este modelo se caracteriza por presentar una copia humanizada del gen de App murino. Además, se introdujo la mutación Swedish en el gen, alterando su procesamiento e incrementando la cantidad de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, y también la mutación Beyreuther/Iberian, que incrementa la ratio de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40. Sin embargo, los niveles totales de proteína APP permanecen similares a los de animales *wild-type*. La fortaleza de este modelo recae en su capacidad de inducir la formación de placas de A $\beta$ , la neuroinflamación y algunas alteraciones cognitivas sin necesidad de sobreexpresar APP (Saito et al., 2014).

### **3. Pruebas de comportamiento**

Con el fin de evaluar las capacidades cognitivas de los ratones en los diferentes dominios cognitivos se realizaron pruebas de comportamiento. Estas pruebas fueron grabadas con una cámara cenital y los

vídeos analizados siempre que fue posible utilizando un software de seguimiento automatizado *Any-Maze* (Stoelting Europe, Irlanda). La plataforma se limpió entre los diferentes animales aplicando etanol al 10% para eliminar los olores y evitar sesgos y artefactos. Un protocolo se considera retrógrado cuando la fase de adquisición del recuerdo se produce antes de iniciar el procedimiento experimental (BCAS o HSD) y se considera anterógrado si dicha fase se produce después del inicio del procedimiento experimental.

### 3.1 Prueba de nueva localización de objeto (NOL, del inglés *Novel Object Location*)

Esta prueba permite estudiar la memoria espacial de referencia de los ratones, ya que deben recordar y discriminar la nueva ubicación de un objeto basado en referencias espaciales. Se utilizó una caja experimental cuadrada (45x45x45 cm) y dos objetos idénticos. La prueba consta de un día de habituación, en el que los ratones se colocaron en la caja sin objetos y con pistas espaciales durante un período de 30 minutos, seguido del día de prueba. Durante el día de la prueba, los ratones se colocaron en la caja con ambos objetos ubicados en el mismo lado durante 5 minutos, dejándoles explorar y recordar la localización de los objetos basándose en las pistas espaciales. Los ratones fueron devueltos a sus jaulas durante 30 minutos y luego se les volvió a introducir en la arena durante 5 minutos, pero con uno de los objetos colocado en una nueva ubicación. El comportamiento se registró mediante una cámara cenital y el tiempo de exploración se midió manualmente para ambos objetos (Fig. 13 A). El índice de reconocimiento (RI) se calculó de la siguiente manera:  $RI = [\text{tiempo nueva ubicación} / (\text{tiempo nueva ubicación} + \text{tiempo ubicación antigua})]$ . Se consideró exploración de un objeto cuando el animal interactuaba directamente o miraba el objeto a una distancia cercana. No se consideró exploración el hecho de subirse encima del objeto.

### 3.2 Reconocimiento de nuevo objeto (NOR, del inglés *Novel Object Recognition*)

La prueba NOR explora la memoria episódica de los ratones basándose en el reconocimiento y discriminación de la forma de objetos. Esta prueba se realizó en la misma arena que el NOL y el día de habituación fue idéntico a excepción de que no se utilizaron pistas espaciales. Durante el día de la prueba, los ratones se colocaron en la caja con dos objetos idénticos situados en el mismo lado durante 5 minutos, dejando a los ratones explorar y memorizar los objetos. Después fueron devueltos a sus jaulas 30 minutos y tras ese tiempo se los introdujo en la arena durante 5 minutos más pero, en esta ocasión, uno de los objetos se sustituyó por otro de una forma claramente diferente. Igualmente se registró mediante grabación de vídeo con una cámara cenital (Fig. 13 B). El índice de reconocimiento se calculó como:  $RI = [\text{tiempo explorando nuevo objeto} / \text{tiempo explorando ambos objetos}]$ . La exploración fue considerada como se explica para la prueba NOL.

Tanto para el NOL como para el NOR, índices de reconocimiento por encima de 0,5 indican preferencia por la localización o el objeto novedoso, por lo que estarían discriminando adecuadamente.

### 3.3 Prueba de campo abierto (OF, del inglés *Open Field*)

La prueba de campo abierto se utiliza para evaluar el comportamiento ansioso de los ratones, basado en su tendencia natural a evitar los espacios abiertos y sentirse más seguros en los bordes y en la periferia de la arena. Así, cuando los ratones ven incrementada su ansiedad, también incrementan el tiempo que emplean en la periferia de la arena del campo abierto. Utilizando la habituación al aparato usado para la prueba NOR, cuantificamos el tiempo empleado por los animales en el centro y en la periferia de la arena. Los animales se introdujeron en el aparato durante 5 minutos, en los que fueron grabados con una cámara cenital. Posteriormente se dibujaron 3 zonas: centro, intermedia y periferia y se representaron gráficamente los tiempos empleados en el centro y la periferia (Fig. 13 C).

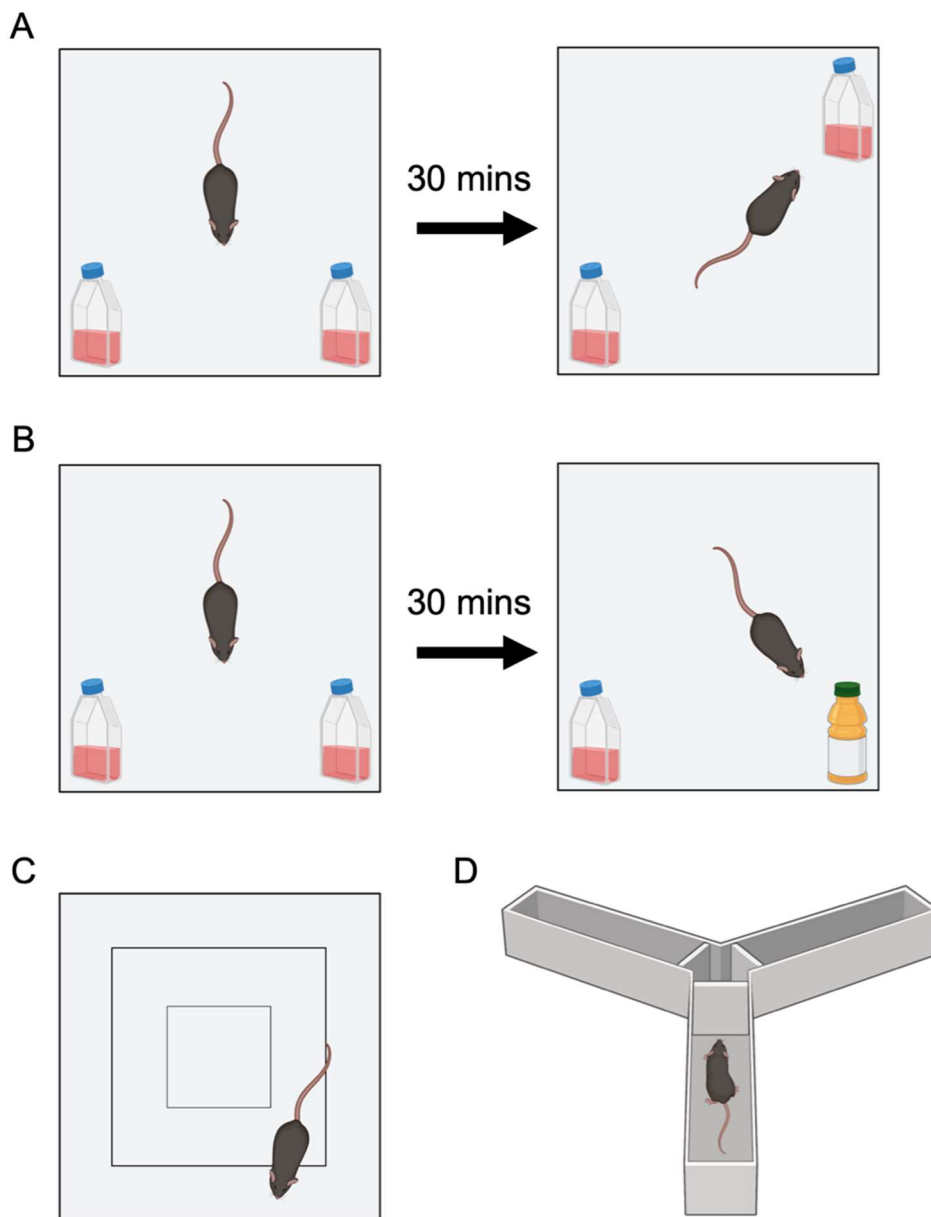


Fig.13. Esquemas representativos de las pruebas de comportamiento (A) NOL, (B) NOR, (C) Campo abierto y (D) SAP en el laberinto en Y.

### 3.4 Test de las alternancias espontaneas (SAP, del inglés *Spontaneous Alternation Performance*)

La prueba SAP evalúa el funcionamiento de la memoria espacial de trabajo. Se basa en la tendencia natural de los ratones a explorar lo novedoso y en su capacidad de orientación espacial egocéntrica. Se realiza en un laberinto compuesto por tres brazos iguales (30x6x15 cm) separados por ángulos de 120 grados, formando un aparato en forma de Y. Se permitió a los ratones explorar libremente el laberinto durante 5 minutos, y se anotó el número total y la secuencia de las entradas a los brazos (Fig. 13 D). Se consideró comportamiento de alternancia cuando los ratones entraban a los tres brazos de manera consecutiva (ABC, BCA, CAB, etc.). El número de alternancias se dividió por el número máximo de alternancias posibles (número total de entradas menos 2) y se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de alternancias espontáneas.

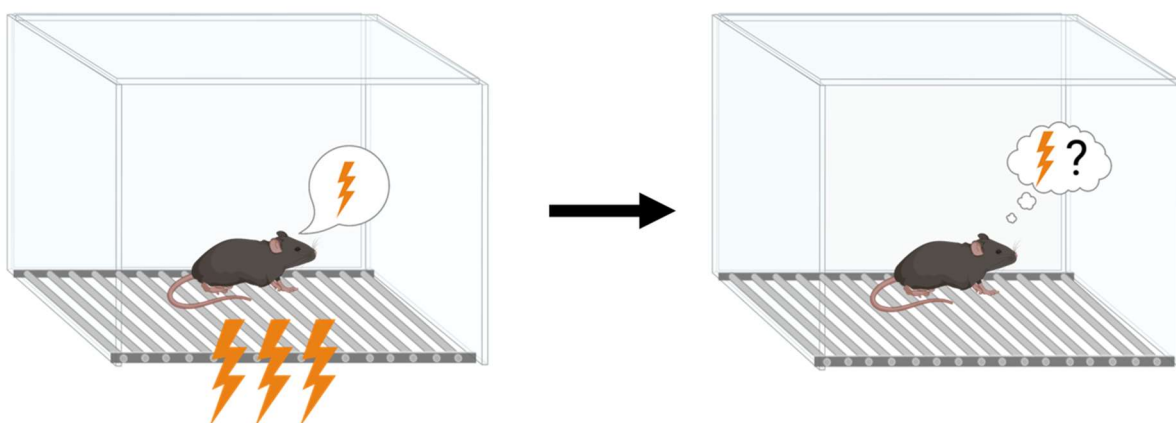


Fig.14. Esquema representativo de la prueba de comportamiento de condicionamiento al miedo contextual.

### 3.5 Prueba de condicionamiento al miedo contextual (CFC, del inglés *Contextual Fear Conditioning*)

Esta prueba explora la memoria episódica. Para ello se asocia un entorno o contexto con un estímulo aversivo provocando una respuesta condicional de miedo frente a ese contexto. Esto permite posteriormente, analizando la respuesta de miedo, evaluar la capacidad del animal para recordar el episodio. Dependiendo del diseño del test, de si el condicionamiento se realiza antes o después de inducir el modelo de la patología, se tratará de una versión retrógrada o anterógrada de la prueba respectivamente. Y asimismo evaluará de modo diferente la función cognitiva, poniendo mayor énfasis en el aprendizaje o en la capacidad de recordar.

De este modo, para realizar el CFC, cada ratón se somete a dos fases en el mismo contexto: una de condicionamiento en la que recibe el estímulo aversivo y una posterior de *retrieval* o de recuperación de la memoria en la que no recibe ningún estímulo aversivo y en la que se cuantifica su respuesta de miedo. Para la fase de condicionamiento, los ratones fueron colocados en la cámara de pruebas con dimensiones de 31x24x21 cm, la cual tenía un suelo de rejilla electrificada, y se les permitió explorar libremente durante

150 segundos. Como estímulo de condicionamiento, se administraron tres descargas eléctricas en las patas (0.6 mA, 2 segundos de duración), separadas por intervalos de un minuto. Un minuto después de la última descarga eléctrica, los ratones fueron retirados de la cámara. Para la recuperación de la memoria, los ratones se colocaron nuevamente en la misma cámara. Durante esta sesión de recuperación, se registró el comportamiento de los ratones mediante una cámara cenital durante 5 minutos (Fig. 14). Se midió el *freezing* o congelamiento, que se define como la ausencia total de movimiento excepto por la respiración y que está directamente relacionado con la asociación que hace el animal entre el estímulo aversivo y el contexto.

## 4. Técnicas experimentales in vivo

### 4.1 Estudio de permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE)

Con el fin de determinar la permeabilidad de la BHE, se inyectó por vía intravenosa un dextrano fluorescente (fluoresceína) de peso molecular 70KDa para medir la fluorescencia remanente en el tejido tras lavar con solución salina el árbol vascular por perfusión transcárdica.

Así, se inyectaron 350 µg intravenosos por vía retroorbital y, tras esperar 15 minutos, se procedió al sacrificio de los animales (como en 5.1): se inyectó pentobarbital sódico por vía intraperitoneal; una vez sedado el animal, se perfundió transcárdicamente con PBS y posteriormente con paraformaldehído. Se extrajeron los cerebros y se procesaron normalmente.

### 4.2 Arterial Spin Labelling (ASL)

La medición del flujo sanguíneo cerebral (CBF, del inglés *Cerebral Blood Flow*) se realizó utilizando una aplicación de la técnica de resonancia magnética (RM) de recuperación de inversión alternada sensible al flujo conocida como *arterial spin labelling* (Kober et al., 2004; Schindelin et al., 2012). Se realizó ASL utilizando un escáner Agilent/Varian de 7 T (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con una consola DD2 y un gradiente blindado activamente 205/120, así como una combinación de una bobina de volumen y una bobina de superficie para la transmisión y recepción de la señal de RM.

Para la adquisición de imágenes, los ratones fueron sedados utilizando isoflurano al 2% y un flujo de oxígeno de 1.8 L/min. Se aplicó gel oftálmico en los ojos y se mantuvo la temperatura corporal a 37°C para evitar la hipotermia utilizando un sistema de flujo de aire caliente controlado por una sonda rectal que mide la temperatura del animal (SAll gating and monitoring systems for small animal, SA Instruments).

Se adquirieron imágenes ASL de una sección axial (nivel del hipocampo, bregma: -2 mm) en experimentos no selectivos y selectivos de rebanada. Para cada experimento, se adquirieron veintidós imágenes con diferentes tiempos de inversión utilizando una secuencia de espín rápido multi-sección (fsems) con los siguientes parámetros: TR/TE, 10000/5.05 ms; número de promedios, 1; tamaño de matriz, 96 × 96; FOV, 23 × 20 mm; resolución espacial en el plano, 240 × 208 µm; grosor de la sección, 2 mm; y número de secciones, 1. Se utilizaron los siguientes valores de tiempo de inversión: 30, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1950, 2100 y 2300 ms. El tiempo

total de exploración fue de 22 min 20 s. La imagen de CBF se calculó a partir de las 44 imágenes obtenidas utilizando MatLab (MathWorks) siguiendo las ecuaciones descritas (Schindelin et al., 2012). El análisis de las regiones de interés (ROI) en las imágenes de CBF se realizó utilizando el software gratuito FIJI (Schindelin et al., 2012). Para ello, se dibujaron ROIs circulares de área constante en las regiones de corteza, hipocampo y tálamo sobre el mapa anatómico de T1. Mediante esas ROIs, se midió el flujo sobre el mapa de ASL; además se trazó una ROI con todo el mapa menos las últimas 2-3 líneas de píxeles, puesto que suelen dar valores artefactualmente altos al ser el borde de la imagen.

#### **4.3 Medida de la presión arterial**

Para medir la presión arterial de los ratones se utilizó un sistema (BP-2000 series II, Visitech Systems), basado en un manguito que se coloca en la cola de los animales. El procedimiento consta de una semana de aclimatación y habituación al aparato y las mediciones, para reducir la variabilidad derivada por el estrés que supone la propia medición, y de una semana de toma de las medidas definitivas. Adicionalmente, cada día se hacen 10 medidas de entrenamiento y 10 medidas válidas consecutivas. De las 10 medidas finales se descartan aquellas con más de 2 desviaciones estándar respecto al resto y con las restantes se hace la media de ese día. Cada semana se hacen 5 días de medición consecutivos.

#### **4.4 Medidas de parámetros bioquímicos y hematológicos**

En primer lugar, se extrajeron los volúmenes adecuados de sangre mediante punción submaxilar para acceder al seno venoso submandibular de los ratones. Para la hematología se extrajeron aproximadamente 50  $\mu$ L de sangre en tubos con EDTA, para evitar su coagulación. Para las bioquímicas, entre 200 y 250  $\mu$ L de sangre en tubos Eppendorf™.

La determinación de los parámetros hematológicos la realizaron los técnicos de fisiología animal del CNIC por medio del analizador hematológico automático Pentra 80 (Horiba ABX SAS).

Para la cuantificación de los parámetros bioquímicos, primero se debía obtener el suero. Por tanto, en primer lugar, se dejaron coagular las muestras de sangre a temperatura ambiente durante 15 minutos, tras lo que se centrifugaron a 4.500 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante es el suero, que se llevó a un nuevo tubo y se entregó a los técnicos de fisiología animal del CNIC para su análisis en el analizador dimensional RxL Max (Siemens Healthineers).

### **5. Técnicas experimentales ex vivo**

#### **5.1 Sacrificio de los animales y obtención de muestras**

Después de una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal) 400 mg/Kg y de que los animales estuvieran bajo sedación profunda, se realizó una perfusión transcardíaca con tampón fosfato (0,1 M), seguida de paraformaldehído (PFA) al 4%. Los cerebros fueron fijados en PFA durante 18h aproximadamente a 4°C y transferidos a sacarosa al 30% (p/v); una vez deshidratados, pasadas al menos 48h, se congelaron utilizando para ello isopentano enfriado con hielo seco a -80°C. Posteriormente se

obtuvieron secciones coronales de 30  $\mu\text{m}$  con un microtomo de deslizamiento (SM2010R, Leica), que se almacenaron en una solución crioprotectora (etilenglicol 30%, glicerol 20%, tampón fosfato 50%) a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Para los estudios de morfología, en algunos de los grupos experimentales se realizaron también cortes de 50  $\mu\text{m}$  y para los ensayos de caspasa se utilizaron cortes de 20  $\mu\text{m}$  obtenidos con un criostato (CM1950, Leica).

Para la obtención de muestras de tejido cerebral (corteza e hipocampo) de las que extraer proteína o RNA, se procedió de la misma manera salvo que la perfusión transcardíaca se realizó solo con tampón fosfato, sin utilizar a continuación PFA. Posteriormente a la extracción de los cerebros, estos fueron diseccionados para obtener las regiones cerebrales pertinentes y congelados inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su conservación hasta su procesamiento. En el grupo de animales modelo de la EA (APP<sup>NL-F</sup>), un hemisferio se fijó con PFA durante 18h a  $4^{\circ}\text{C}$  y el otro se diseccionó para obtener muestras de proteína de corteza e hipocampo.

## 5.2 Histología

### 5.2.1 Tinción de Nissl y medidas de volumen del hipocampo

La tinción de Nissl es una tinción histológica ampliamente usada en neurociencias. Se basa en la utilización de violeta de cresilo (C5042, Sigma-Aldrich) para marcar estructuras ácidas, especialmente el núcleo y acumulaciones de ribosomas asociadas al retículo endoplásmico. Puesto que su marcaje se asocia con la actividad de producción proteica de las células además de como tinción de contraste, permite identificar zonas infartadas como hipocromáticas. Para las medidas de volumen del hipocampo, se tiñeron secciones de 30  $\mu\text{m}$  tomadas cada 300  $\mu\text{m}$ . El proceso de tinción se realiza de la siguiente manera:

- Los cortes se montan en portaobjetos (SuperFrost®, Thermo Scientific) y se dejan secar y adherir.
- Se hidratan con agua y se tiñen con una solución acuosa de violeta de cresilo al 0,5% durante 5 minutos.
- Se deshidratan con un gradiente de alcoholes (75%, 90% y 100% etanol), 5 minutos cada uno.
- Se sumergen en xileno (534056, Sigma-Aldrich) durante 5 minutos.
- Finalmente se coloca el cubreobjetos utilizando DPX (06522, Sigma-Aldrich) como medio de montaje.

Las secciones teñidas se visualizaron bajo un microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i, Nikon Corporation) acoplado al software StereoInvestigator 6 (MicroBrightfield Inc.). Se obtuvieron estimaciones volumétricas del giro dentado y del hipocampo completo mediante la estimación de Cavalieri en cuatro secciones consecutivas. La cuadrícula empleada fue de 100 y 20  $\mu\text{m}^2$ , para el hipocampo y el giro dentado respectivamente.

### 5.2.2 Inmunohistoquímica

El marcaje de caspasa-3 activada se realizó mediante inmunohistoquímica (IHQ), revelada con diaminobencidina. Para ello se utilizó un sistema automático de IHQ. Se realizó con los cortes de 20  $\mu$ m previamente montados en los portaobjetos. El primer paso fue un desenmascaramiento de antígenos que consistió en una incubación de 30 minutos a 37°C en una solución de Tris 10 mM y EDTA 1 mM. A continuación, se bloquearon las secciones en Triton X-100 al 0,3% y albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) al 1% en PBS durante 1 hora y se incubaron con el anticuerpo primario en la misma solución durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo primario fue anti-caspasa-3 (Asp175) (1:100, Cell Signaling). Después de los lavados, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario (HRP anti-conejo) y se revelaron con diaminobencidina. También se realizó una tinción de contraste con hematoxilina.

### 5.2.3 Inmunofluorescencia

Las inmunofluorescencias se realizaron en secciones en flotación. Primero, las secciones se permeabilizaron y bloquearon en Triton X-100 al 0,3% y BSA al 1% en PBS durante 2 horas, y se incubaron durante la noche a 4°C en la misma solución con los anticuerpos primarios: anti-DCX (*rabbit*, 1:400, Abcam), anti-Ki-67 (*rat*, 1:200, Invitrogen), anti-GFAP (*rabbit*, 1:2000, Agilent; o *chicken*, 1:500, Invitrogen), anti-nestina (*chicken*, 1:400, AvesLabs) y anti- $\beta$ -amiloide (1:250, BioLegend), dependiendo del ensayo. Tras 3 lavados con PBS de 10 minutos de duración, se incubaron con los anticuerpos secundarios en la misma solución de Triton X-100 y BSA durante 2h. Anticuerpos secundarios utilizados: anti-*rabbit* biotinilado (1:400, VectorLab), anti-*rat* 568 (1:500, Thermo Fisher), AlexaFluor® (AF) 647 anti-*chicken* (1:500, Invitrogen), AF 488 anti-*chicken* (1:500, Invitrogen), AF 568 anti-*mouse* (1:500, Invitrogen). Tras la incubación se volvió a lavar 3 veces con PBS durante 10 minutos. En el caso de la inmunofluorescencia de DCX, se incubó a continuación con estreptavidina-488 (1:500, Biolegend) durante 1h en PBS, y posteriormente se lavaron los cortes 3 veces durante 10 minutos. En el segundo lavado de la última ronda de lavados se incorporó DAPI (1:5000, Thermo Fisher) como marcador nuclear. Finalmente, los cortes se montaron sobre portaobjetos, se dejaron secar y se cubrieron con el medio de montaje acuoso basado en glicerol Aqua-Poly/Mount (Polysciences).

La inmunofluorescencia de A $\beta$  siguió un protocolo modificado del anterior. Previamente al bloqueo, se realizó un desenmascaramiento de antígenos con ácido fórmico al 70% durante 10 minutos y se lavó con PBS. Posteriormente se incubó con una solución de glicina 1M durante 30 minutos, se lavó con PBS y se continuó como está descrito arriba salvo que la solución de bloqueo (utilizada también para incubar los anticuerpos) fue: PBS, BSA 5% y Triton X-100 0,25%. Tras montar los cortes se hizo la tinción con tioflavina S (ThioS) para detectar las placas densas. Para ello, los portaobjetos fueron sumergidos en una solución de ThioS al 1% en agua durante 30 minutos. Después, se incubaron 3 minutos en una solución de etanol al 50% y, a continuación, se aclararon en agua destilada durante 2 minutos. Finalmente se cubrieron los portaobjetos con Aqua-Poly/Mount.

#### 5.2.4 Captura de imágenes

Las imágenes de la inmunohistoquímica se obtuvieron con un sistema de escáner automático Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss) con un objetivo 20X.

Las imágenes de fluorescencia de dextrano extravasado utilizadas para medir la permeabilidad de la barrera hematoencefálica se tomaron con un microscopio óptico de fluorescencia Leica DM6B Upright Navigator utilizando el objetivo 20X. Se obtuvieron imágenes *tile-scan* de ambos hipocampos y de 3 planos focales.

Las imágenes de las inmunofluorescencias se obtuvieron con microscopios confocales Leica TCS SP5 y SP8. Las imágenes de astrocitos tras cinco semanas de HSD se adquirieron con el microscopio TCS SP5 utilizando un objetivo 20X. Las demás adquisiciones se realizaron con un TCS SP8 equipado con detectores híbridos espectrales, módulo *Navigator*<sup>®</sup> y se utilizó un objetivo 40X de aceite. En todos los casos se obtuvieron imágenes *z-stack* de al menos 4 hipocampos/giros dentados en su región rostral y posteriormente se procesaron en 3D o mediante la proyección máxima de los planos confocales obtenidos.

### 5.3 Extracción de proteínas y *western-blot*s

#### 5.3.1 Homogeneización del tejido y extracción de proteínas

Las muestras de corteza o hipocampo se descongelaron en hielo. Una vez descongeladas se transfirieron a tubos compatibles con el homogeneizador TissueLyser (Thermo Fisher) y se añadió el buffer de homogeneización de proteínas RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, ácido deoxicólico 0.5%, Triton X-100 1%, SDS 0,5%, EDTA 25 mM, NaF 20 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, suplementado con inhibidores de proteasas y de fosfatasa, según indicaciones del fabricante, (cOmplete<sup>™</sup> y PHOSTOP<sup>™</sup>, Roche)) (200 uL para hipocampo y 400uL para corteza) y 3 perlas cerámicas (1.4 mm, ZrO<sub>2</sub>, Bertin Corp) a cada muestra. Se llevaron al TissueLyser y se homogeneizaron durante 2 minutos a 30Hz, se dejaron en hielo 5 minutos y se repitió el proceso una vez más. A continuación, se transfirió la fracción líquida a un nuevo tubo Eppendorf<sup>®</sup> y se centrifugaron a 14.000g a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante fue retirado y congelado para su posterior uso o utilizado inmediatamente después para medir la concentración de proteínas y continuar preparando la muestra para el *western-blot*.

Para la separación en las fracciones altamente soluble, soluble e insoluble de las proteínas de hipocampo, se realizaron tres ciclos de extracción consecutivos variando la solución tampón y con ello las proteínas con capacidad de ser disueltas y homogeneizadas en cada fase. Para separar las proteínas solubles en cada fase del resto, se centrifugó tras cada ciclo de homogeneización a 50.000g a 4°C durante 20 minutos. Inicialmente, los hipocampos se homogeneizaron por disgregación mecánica (Tissue Lyser) en 150 µl de tampón RAB (100 mM MES, 1 mM EDTA, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 750 mM NaCl, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa, Roche). Tras la primera centrifugación, el sobrenadante fue recogido como fracción soluble para RAB y el pellet fue resuspendido y homogeneizado mediante sonicación en el mismo volumen de RIPA, y seguidamente las muestras fueron centrifugadas.

El sobrenadante se recogió como fracción soluble para RIPA y el pellet fue resuspendido y homogenizado mediante sonicación en 150 µl de ácido fórmico (FA, del inglés *formic acid*) al 70% en agua. Se centrifugaron por última vez. El sobrenadante se recogió como fracción soluble en ácido fórmico. Todas las fracciones fueron conservadas a -80°C (Faraco et al., 2019). Para la cuantificación por *western-blot* se separaron alícuotas de 50 µl de la fracción FA y se evaporaron en Savant SpeedVac a 45°C durante 1h; a continuación, se resuspendieron en 100 µl de buffer Laemmli con 1 µl de NaOH 10N, se sonicaron y se hirvieron durante 10 minutos.

### 5.3.2 SDS-PAGE y *western-blot*

El primer paso es la cuantificación y preparación de las muestras para poder ser cargadas en un gel de poliacrilamida. Para su cuantificación, se utilizó el kit Pierce™ BCA® Protein Assay (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se prepararon las muestras mezclándolas con agua y tampón Laemmli (4x Laemmli protein sample buffer, BIO-RAD) hasta dejarlas a una concentración entre 3 y 6 µg/µL. Estas se hirvieron durante 10 minutos a 95°C.

El día del SDS-PAGE (del inglés, *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) o el día anterior se prepararon los geles de poliacrilamida al 10%. Se cargaron 15-20 µg de proteína (dependiendo del experimento) y se realizó la electroforesis hasta que las proteínas de 24 KDa llegaron al final del frente. Entonces se detuvo la electroforesis y se continuó con el *western-blot* realizando la transferencia de las proteínas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) durante 90 minutos a 200mA constantes por cubeta de transferencia. Finalizada la transferencia se lavaron las membranas con TBS-T (Tween 20 al 0,1%) y se bloquearon durante 1 hora en TBS-T con leche en polvo al 5% (p/v). La incubación de los anticuerpos primarios se realizó durante la noche a 4°C en la misma solución de bloqueo. Estos anticuerpos primarios fueron: Anti-P-TAU (44-768G, 1:1000, Invitrogen) o (AT8, 1:1000, Invitrogen) y anti-TAU (Tau46, 1:1000, Cell Signalling). Al día siguiente, se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 minutos cada lavado y se incubaron con los anticuerpos secundarios en la misma solución de bloqueo: HRP anti-*rabbit* (1:2.500, Invitrogen) y HRP anti-*mouse* (1:2.500, Invitrogen) durante 1h. Finalmente, se volvieron a lavar como en el paso anterior y se incubaron con la solución de revelado quimioluminiscente Clarity ECL (BIO-RAD) o Super Signal™ West FEMTO (Thermo Scientific) en el sistema de revelado digital iBright (Thermo Fisher). Finalizada la cuantificación de TAU y P-TAU se cuantificó la actina. Para ello se lavaron las membranas durante 30 minutos con 4 cambios de TBS-T y se procedió a incubar las membranas en solución de bloqueo con el anticuerpo primario anti-actina (1:2.500, Sigma-Aldrich) durante 1 hora. Se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-*rabbit*-HRP (1:5.000, Invitrogen) durante 1 hora más. Acabado ese tiempo, se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 minutos y se revelaron utilizando el sustrato Clarity ECL.

αP-TAU (44-768G): Ser199, Ser202

αP-TAU (AT8): Ser202, Thr205

### 5.3.3 Cuantificación de los *western-blots*

La cuantificación de los *western-blots* se realizó mediante FIJI (ImageJ, NIH). Se dibujaron regiones alrededor de cada banda y en una zona de ruido de fondo, se midió la intensidad media y el área de cada región. A la intensidad total de la banda (el producto de la intensidad media por su área) se le restó la señal debida al ruido de fondo (el producto de la intensidad media de la región de ruido de fondo por el área de la región de interés) para obtener la señal producida por cada banda libre de ruido de fondo. Estos valores se normalizaron por la media de los animales controles y en su caso por la señal de su actina o de TAU según se indica en cada gráfico.

## 5.4 Análisis de expresión génica mediante qRT-PCR

### 5.4.1 Homogeneización y extracción de RNA

La homogeneización de las muestras es muy similar a la que se realiza para extraer proteínas, a excepción de que en lugar de usar RIPA se utilizó 500  $\mu$ L de TRIzol™ (Invitrogen). Una vez realizada la disgregación mecánica se mezcló el trizol con 100  $\mu$ L de cloroformo, se mezclaron bien y se centrifugaron a 15.000 g durante 10 minutos a 4°C. Después se obtuvo el sobrenadante del que se aisló y purificó el RNA con el kit RNeasy Plus Mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se eluyó en 10  $\mu$ L de agua libre de DNAsas y RNAsas.

### 5.4.2 Retrotranscripción del RNA a cDNA

Las muestras fueron cuantificadas utilizando un NanoDrop™ (Thermo Fisher). Una parte de la muestra, 2  $\mu$ g, se utilizó para producir DNA de doble hebra (DNA complementario) utilizando el kit de transcripción reversa de cDNA de gran capacidad (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El resto de la muestra se congeló a -80°C. Y el cDNA sintetizado se almacenó a -20°C hasta su uso para realizar la qRT-PCR.

### 5.4.3 qRT-PCR

La cuantificación de la expresión génica se realizó mediante cuantificación relativa por medio de una PCR en tiempo real utilizando SYBR® Green. Para ello, se cargaron las muestras por triplicado en una placa de 96 pocillos compatible con el termociclador 7900HT Fast (Applied Biosystems). También se preparó una mezcla para añadir a cada reacción de PCR consistente en: SYBR green (2X), los oligonucleótidos correspondientes y agua. Para programar el termociclador se siguieron las instrucciones de la casa comercial del reactivo SYBR.

El análisis de los datos de la qRT-PCR se realizó ajustando los valores de ciclo umbral (CT, del inglés *Cycle Threshold*) para coincidir con la máxima pendiente de amplificación. Posteriormente se calculó la media de las tres réplicas, eliminando aquellos replicados que se alejasen más de 3 veces la desviación estándar. Con los datos de las medias para cada animal se calculó el  $\Delta$ CT (Ct(gen diana)-Ct(gen normalizador)). Se utilizó uno de los animales control para normalizar todas las muestras y así se

obtuvieron los  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct$  (muestra) –  $\Delta Ct$  (calibrador)) y finalmente  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  fue usado como medida relativa de la expresión génica.

## **6. Cuantificaciones y análisis**

### **6.1 Cuantificación del número de neuroblastos**

Los neuroblastos se cuantificaron como el número de células DCX<sup>+</sup>. Para ello se contaron manualmente en imágenes 3D visualizadas mediante el software Imaris (Bitplane, Oxford Instruments). Se contaron al menos 4 imágenes del giro dentado en ciego, y se utilizó para el análisis la media de las células de cada giro dentado/sección. Se comprobó que las imágenes se correspondieran aproximadamente con la misma región en el eje rostro-caudal; si alguna imagen se alejaba demasiado, se descartada o se normalizaba por la longitud del giro dentado medido por el marcaje nuclear DAPI en FIJI.

### **6.2 Cuantificación de los neuroblastos proliferativos**

Este análisis se llevó a cabo del mismo modo que el de los neuroblastos, solo se añadió el conteo de las células Ki-67<sup>+</sup> y de las dobles marcadas DCX<sup>+</sup>Ki-67<sup>+</sup> siguiendo el mismo procedimiento.

### **6.3 Estudio de la morfología de los neuroblastos**

Para la adquisición de estas imágenes se utilizó un tamaño de píxel de 0,2029 x 0,2029 x 0,1998. Con el fin de acelerar la captura, se hicieron con el modo resonante y 18 promedios. Estas imágenes 3D de alta resolución fueron analizadas por medio del software Imaris y el módulo *Filaments (Autopath/Autodepth)*. Por medio de esta herramienta se trazó el árbol dendrítico de todas aquellas células DCX<sup>+</sup> con una dendrita apical que se prolongase hacia la capa molecular y de la que se viera la primera ramificación o que midiera al menos 15  $\mu m$ . El trazado no se realizó del árbol dendrítico completo por la dificultad de diferenciar qué rama pertenecía a qué célula en algunos casos; sin embargo, siempre se trazó al menos hasta la primera ramificación. En el caso de aquellas neuronas que no pudieran ser trazadas por poder ser confundidas, los árboles dendríticos con los de las neuronas vecinas se descartaron. La longitud de la dendrita apical fue tomada como la longitud del primer segmento del filamento trazado.

### **6.4 Análisis de la muerte celular**

Las imágenes obtenidas por el escáner automático fueron visualizadas mediante NDP.View2 (Hamamatsu) y se contaron 6-8 giros dentados en los que se identificaron las células caspasa-3<sup>+</sup> por su coloración marrón debida a la diaminobencidina. Después se hizo la media por giro dentado/sección con la que se procedió al análisis estadístico.

### **6.5 Cuantificación de los astrocitos del giro dentado**

Los astrocitos del giro dentado fueron contados utilizando para ello la proyección máxima de las imágenes *z-stack*. Se utilizaron para ello al menos 4 imágenes del giro dentado y se contabilizaron en la capa granular y la zona subgranular. Aquellos con forma de célula progenitora neural quiescente no fueron

contados, al ser estas células también positivas para el marcador GFAP pero claramente diferenciables por su morfología.

### 6.6 Cuantificación de las poblaciones del nicho neurogénico hipocampal

Las imágenes de alta resolución se visualizaron en 3D utilizando Imaris y se contaron las diferentes poblaciones marcándolas con la herramienta *Spots*. Las poblaciones contabilizadas en el giro dentado fueron: células progenitoras neurales quiescentes (QNP, del inglés *Quiescent Neural Progenitor*) y células progenitoras neurales amplificadoras (ANP, del inglés *Amplifying Neural Progenitor*), así como sus subpoblaciones proliferativas.

QNP (Nestina<sup>+</sup>GFAP<sup>+</sup>Ki-67<sup>+/-</sup>)

QNP proliferativas (Nestina<sup>+</sup>GFAP<sup>+</sup>Ki-67<sup>+</sup>)

ANP (Nestina<sup>+</sup>GFAP<sup>-</sup>Ki-67<sup>+/-</sup>)

ANP proliferativas (Nestina<sup>+</sup>GFAP<sup>-</sup>Ki-67<sup>+</sup>)

Se tuvieron en consideración 3 giros dentados por animal y se hizo la media por giro dentado/sección para el análisis estadístico.

### 6.7 Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 9 (Dotmatics). En primer lugar, se observaron los Q-Q plots para evaluar si la distribución de las muestras se ajustaba a los parámetros de normalidad. Se prefirió este método frente a tests estadísticos de normalidad (como Saphiro-Wilks) ya que estos son muy sensibles al número de muestras analizadas. Así mismo también se observaron las distribuciones de las muestras por medio de gráficos de cajas y bigotes (o *boxplot*) para observar los posibles *outliers*, que fueron comprobados con la calculadora de *outliers* online de Prism. Finalmente se compararon las medias de los grupos por medio de la t de Student (si se ajustaban a la normalidad) o los rangos mediante la U de Mann-Whitney (si no se ajustaban a la normalidad).

## Resultados

### 1. Estudio del efecto de la hipoperfusión cerebral global crónica mediante un modelo de estenosis bilateral de las arterias carótidas (BCAS)

Con el fin de estudiar los efectos fisiopatológicos de la hipoperfusión cerebral global crónica, utilizando el modelo de BCAS, se realizó en primer lugar una caracterización fenotípica del modelo. A continuación, se exploraron sus efectos mediante la evaluación de diferentes dominios cognitivos, la función y homeostasis hipocampal y el resto de los objetivos propuestos.

#### 1.1 Descripción del modelo de hipoperfusión BCAS

##### 1.1.1 Evaluación del flujo sanguíneo cerebral en el modelo murino de estenosis bilateral de las arterias carótidas comunes

En primer lugar, comprobamos el descenso de flujo sanguíneo cerebral en los animales sometidos a la cirugía BCAS (Fig. 15). Se utilizó una pequeña cohorte para un seguimiento más continuado (Fig. 15 B) y corroborar los datos publicados por Shibata y colaboradores (Shibata et al., 2004), el resto de los animales se evaluaron a tiempo final, a 1 o tres meses después de la cirugía (Fig. 15 C y D). Los animales BCAS padecen tras la intervención un descenso del flujo acusado, llegando al 50% del flujo de un ratón sham en 72 horas. Tras una semana el flujo vuelve a incrementar y se estabiliza alrededor de un mes después de la cirugía en aproximadamente un 80% del flujo original. Este descenso del flujo persiste tras tres meses desde la implantación de los *microcoils*. Este resultado, consistente con la literatura, confirma la validez del modelo para recapitular la hipoperfusión cerebral global crónica.

##### 1.1.2 Efecto de la hipoperfusión cerebral crónica sobre las características volumétricas del hipocampo

Se realizó un estudio histológico de cortes de hipocampo de animales sham y sometidos a la cirugía BCAS. No se encontraron anomalías visualmente reconocibles por la tinción de Nissl (Fig. 16 A). Asimismo, el análisis volumétrico no mostró diferencias significativas entre ambos grupos experimentales ni uno ni tres meses tras la cirugía (Fig. 16 B).

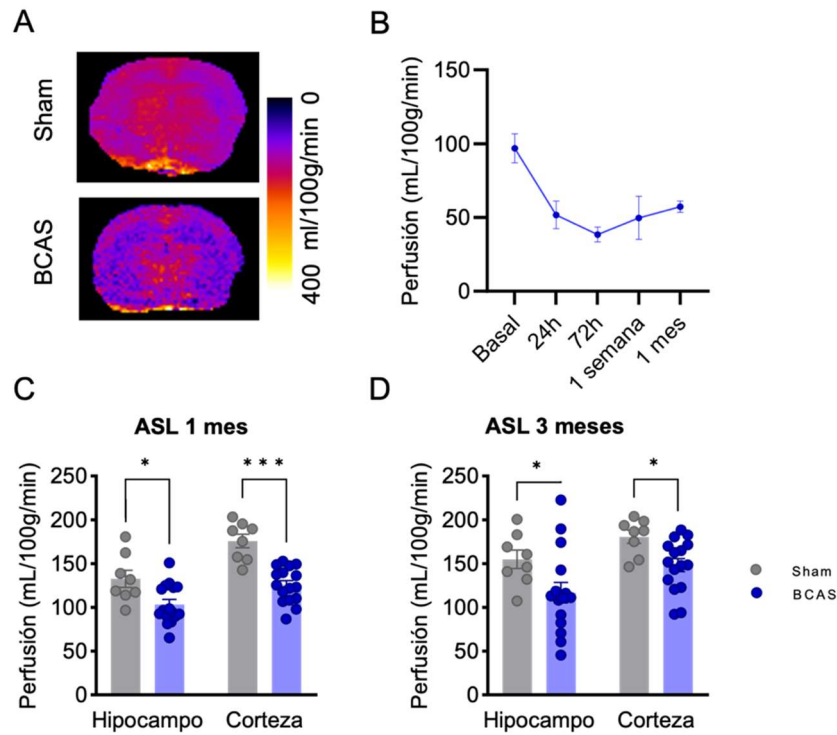


Figura 15. Evaluación del flujo sanguíneo cerebral mediante ASL en el modelo BCAS. (A) Mapas ASL representativos mostrando el flujo sanguíneo cerebral (FSC). (B) Evolución inicial del FSC tras la inducción de la hipoperfusión por BCAS. (C) Cuantificación del FSC 1 mes tras la cirugía en hipocampo y corteza. (D) Cuantificación del FSC tres meses tras la cirugía en hipocampo y corteza. Datos representados como media  $\pm$  SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Sidak.  $n=8-16$  \* $p<0.05$  \*\* $p<0.01$  \*\*\* $p<0.001$ .

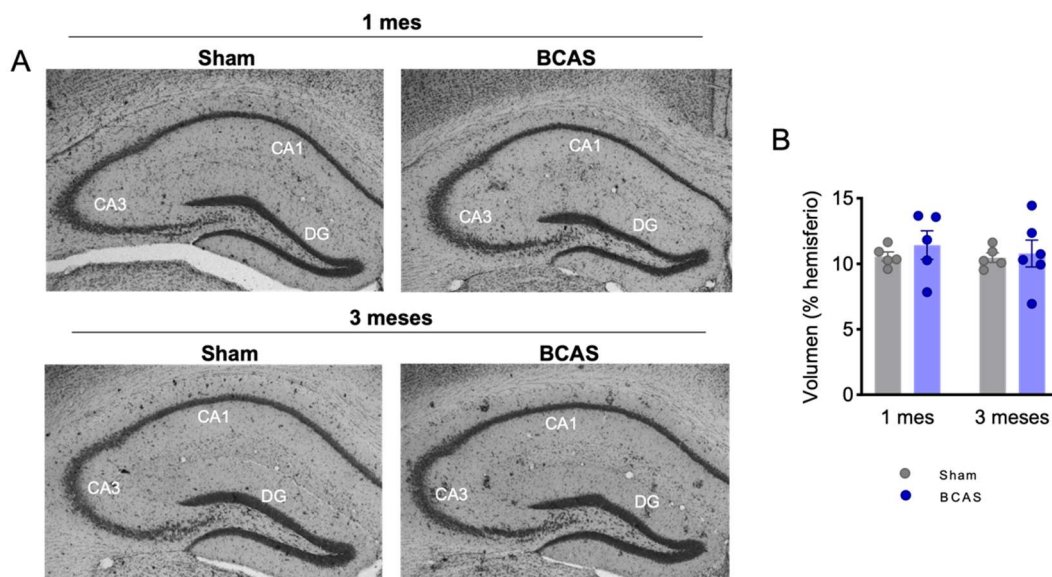


Figura 16. Evaluación histológica del hipocampo mediante tinción Nissl en el modelo BCAS. (A) Imágenes representativas de la tinción de Nissl mostrando el hipocampo de animales sham y BCAS uno y tres meses tras la cirugía. (B) Cuantificación de los volúmenes hipocámpales; los

datos fueron relativizados al tamaño del hemisferio. Datos representados como media  $\pm$  SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Sidak.  $n=5$  \* $p<0.05$ .

### 1.1.3 Efecto de tres meses de hipoperfusión cerebral sobre el estado inflamatorio

Puesto que en la literatura existen artículos que refieren una inflamación y activación inmune al menos en las primeras semanas de hipoperfusión, decidimos explorar la posibilidad de una respuesta inflamatoria tras tres meses de hipoperfusión. Para ello medimos los niveles de citoquinas pro- y anti-inflamatorias mediante qRT-PCR en el hipocampo. En nuestro modelo, no hallamos cambios significativos en los valores de ninguna de las citoquinas evaluadas, proinflamatorias o anti-inflamatorias, al tiempo estudiado (Fig. 17 A).

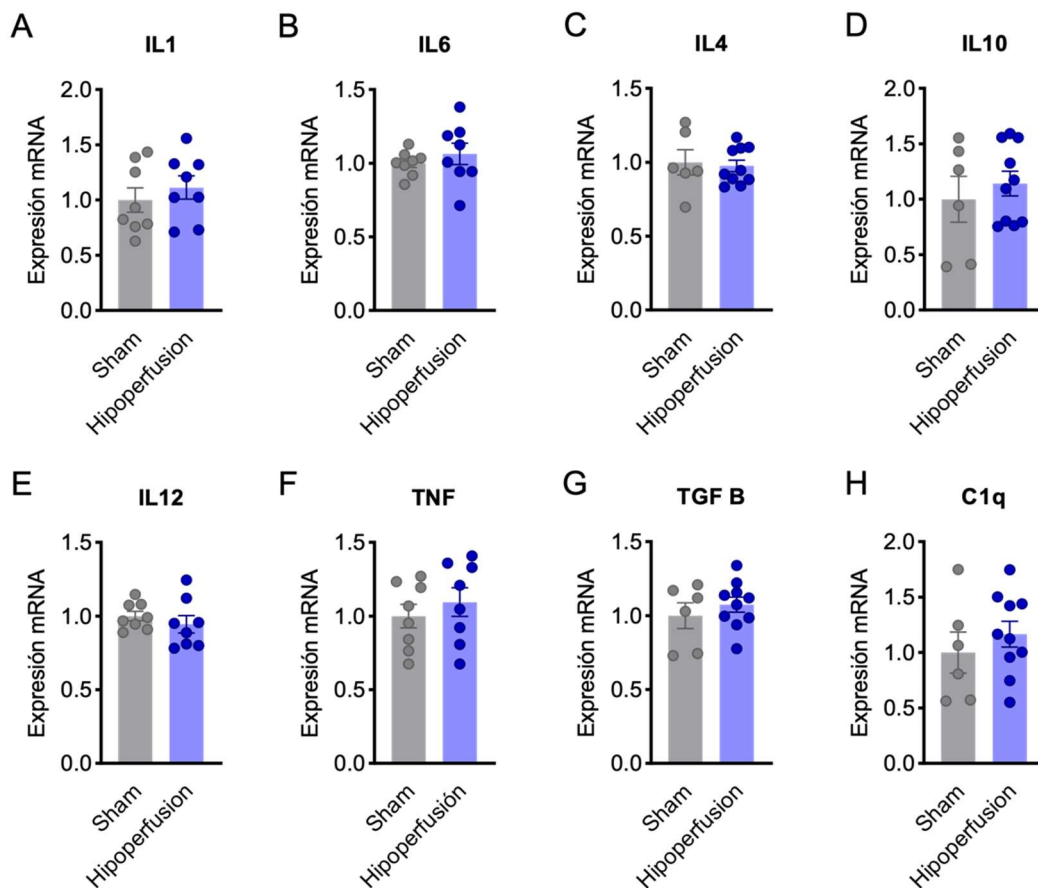


Figura 17. Evaluación del estado inflamatorio cerebral tras tres meses de hipoperfusión. Cuantificación de los niveles de mRNA de citoquinas mediante qRT-PCR en hipocampo de animales sham y BCAS tres meses tras la cirugía. Datos representados como media  $\pm$  SEM y analizados mediante t de Student.  $n=6-10$  \* $p<0.05$ .

## 1.2 Estudio del efecto de la hipoperfusión cerebral crónica en el modelo BCAS sobre la función cognitiva

La función cognitiva en el modelo BCAS ha sido ya explorada a diferentes tiempos tras la hipoperfusión, aunque especialmente se ha centrado en pruebas de aprendizaje como el laberinto en Y, el laberinto de Barnes y el radial de 8 brazos, en los que se halló un peor rendimiento cognitivo. También se han explorado otros como el test de condicionamiento al miedo contextual o el test de Morris, aunque encontrar anomalías cognitivas.

Nosotros decidimos centrarnos en aquellos que dependieran del hipocampo, evaluando así la memoria espacial ya fuera de referencia o de trabajo. Para ello, realizamos el test de nueva localización de objeto (NOL, del inglés *Novel Object Location test*) y el test de alternancias espontáneas (SAP, del inglés *Spontaneous Alternation Performance*).

La prueba SAP mostró que los ratones sometidos a hipoperfusión crónica padecían una alteración de la memoria de trabajo espacial significativa a los tres meses, aunque ya había una tendencia 1 mes tras la cirugía (Fig. 18 B).

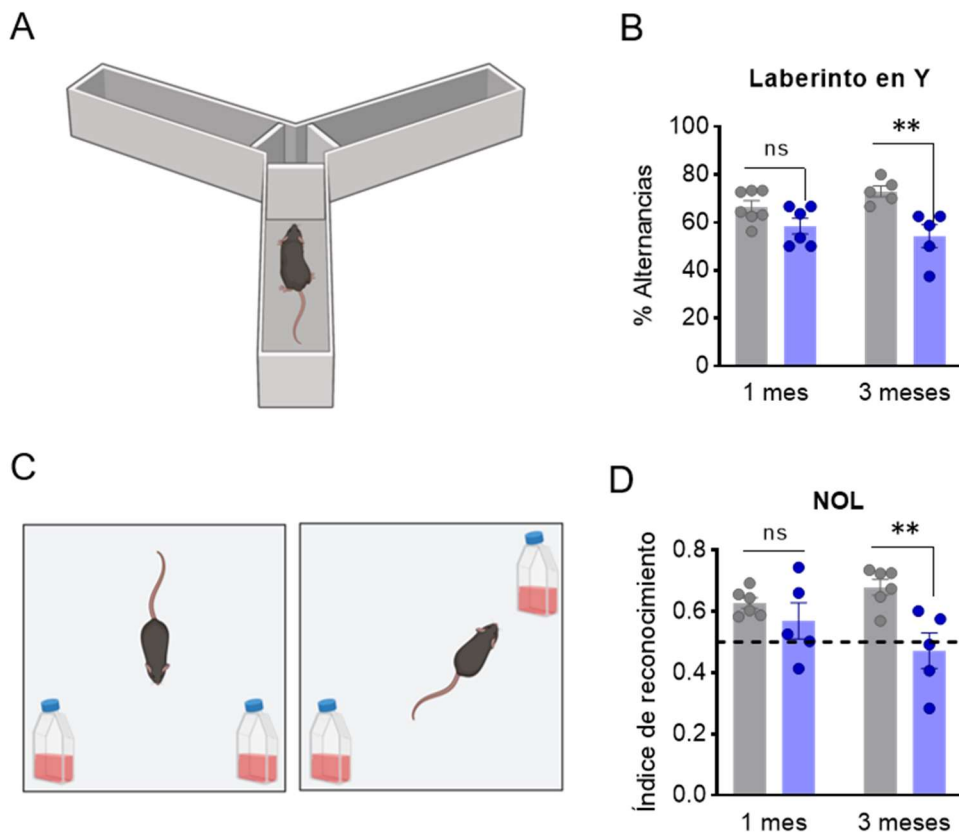


Figura 18. Caracterización de la memoria espacial de trabajo y de referencia en ratones sometidos a 1 o tres meses de hipoperfusión. (A) Diagrama de la prueba SAP en el laberinto en Y. (B) Porcentaje de alternancias realizadas por los animales durante el test SAP. (C) Esquema del diseño experimental del test NOL. (D) Representación del índice de reconocimiento de la

*nueva localización de objeto. Datos representados como media  $\pm$  SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Sidak. n=5-7 \*p<0.05 \*\*p<0.01 ns: no significativo.*

Adicionalmente, el déficit de memoria espacial de referencia explorado en la prueba NOL se observó tras tres meses de hipoperfusión (Fig. 18D), mientras que a 1 mes después de la cirugía no se encontraron diferencias al discriminar la nueva localización del objeto. Por tanto, al menos en nuestro modelo y con el diseño de nuestros tests, los déficits de memoria espacial, de trabajo o de referencia no son significativos hasta una fase crónica más tardía, tras tres meses de hipoperfusión.

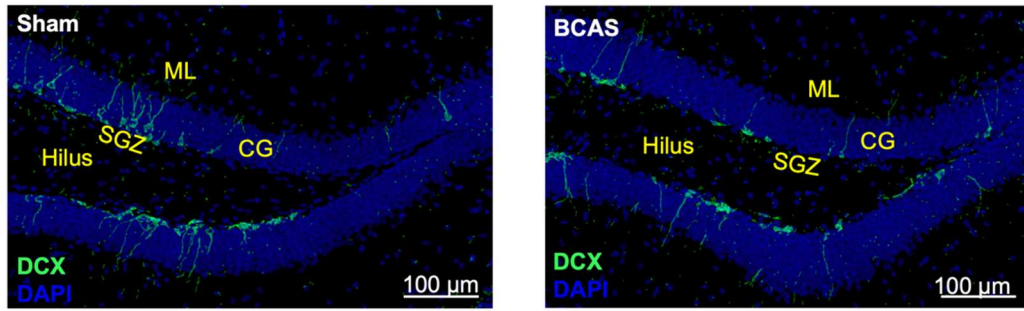
### **1.3 Evaluación del efecto de la hipoperfusión cerebral crónica sobre la neurogénesis hipocampal en el modelo BCAS y los mecanismos implicados**

Puesto que la hipoperfusión crónica inducida por BCAS afecta la memoria dependiente del hipocampo, decidimos centrarnos en sustratos neurológicos involucrados en estos déficits, como la neurogénesis hipocampal adulta.

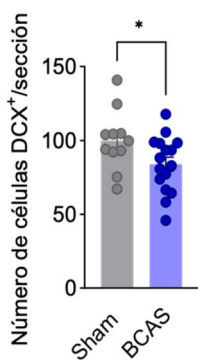
#### **1.3.1 Estudio del efecto de la hipoperfusión cerebral crónica sobre la formación de nuevas neuronas granulares en el giro dentado**

Exploramos posibles alteraciones en la neurogénesis hipocampal, propuesta como base de los trastornos cognitivos en diferentes escenarios (Kim et al., 2022). Cabe destacar que, asociado a un deterioro en las tareas de memoria dependientes del hipocampo, los ratones con BCAS mostraron una disminución significativa en el número de neuronas inmaduras (neuroblastos; DCX<sup>+</sup>) en la capa granular del giro dentado (DG) en comparación con el grupo sham tres meses después de la estenosis (Fig. 19 A-B). Dado que la capacidad para formar y almacenar nuevos recuerdos no solo depende del número de neuroblastos, sino también de su arborización y capacidad de integración en los circuitos hipocampales, investigamos la arborización dendrítica de las nuevas neuronas DCX<sup>+</sup>. De esta manera, encontramos una reducción en el área de DCX<sup>+</sup> ubicada en la capa molecular en relación con el área DCX<sup>+</sup> total en los ratones operados con BCAS (Fig. 19 A,C), hallazgo importante que sugiere cambios morfológicos en la arborización de los neuroblastos después de la hipoperfusión. Para explorar más a fondo esta alteración en la morfología de los neuroblastos, se midió la longitud de las dendritas apicales en imágenes 3D de alta resolución. El análisis mostró un acortamiento significativo en la longitud media de las dendritas apicales en ratones con hipoperfusión (Fig. 19 D-E) en comparación con el grupo sham a los tres meses, junto con un aumento en el porcentaje de neuronas inmaduras con una longitud de dendrita apical más corta (Fig. 19 F).

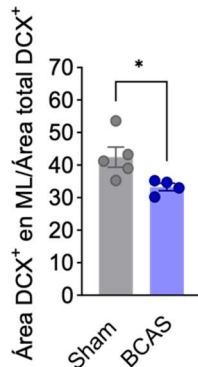
A



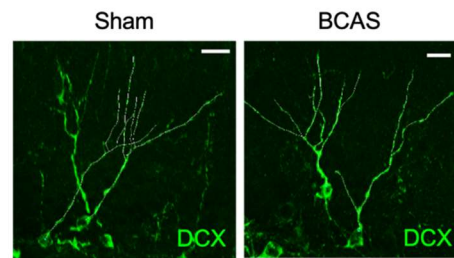
B



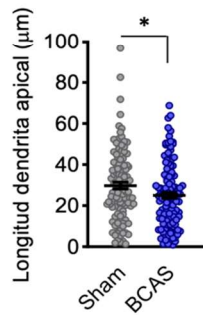
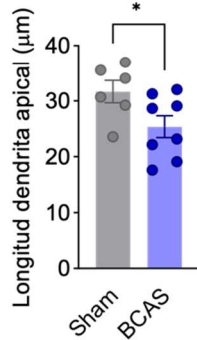
C



D



E



F

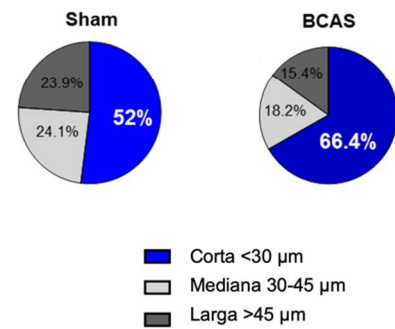
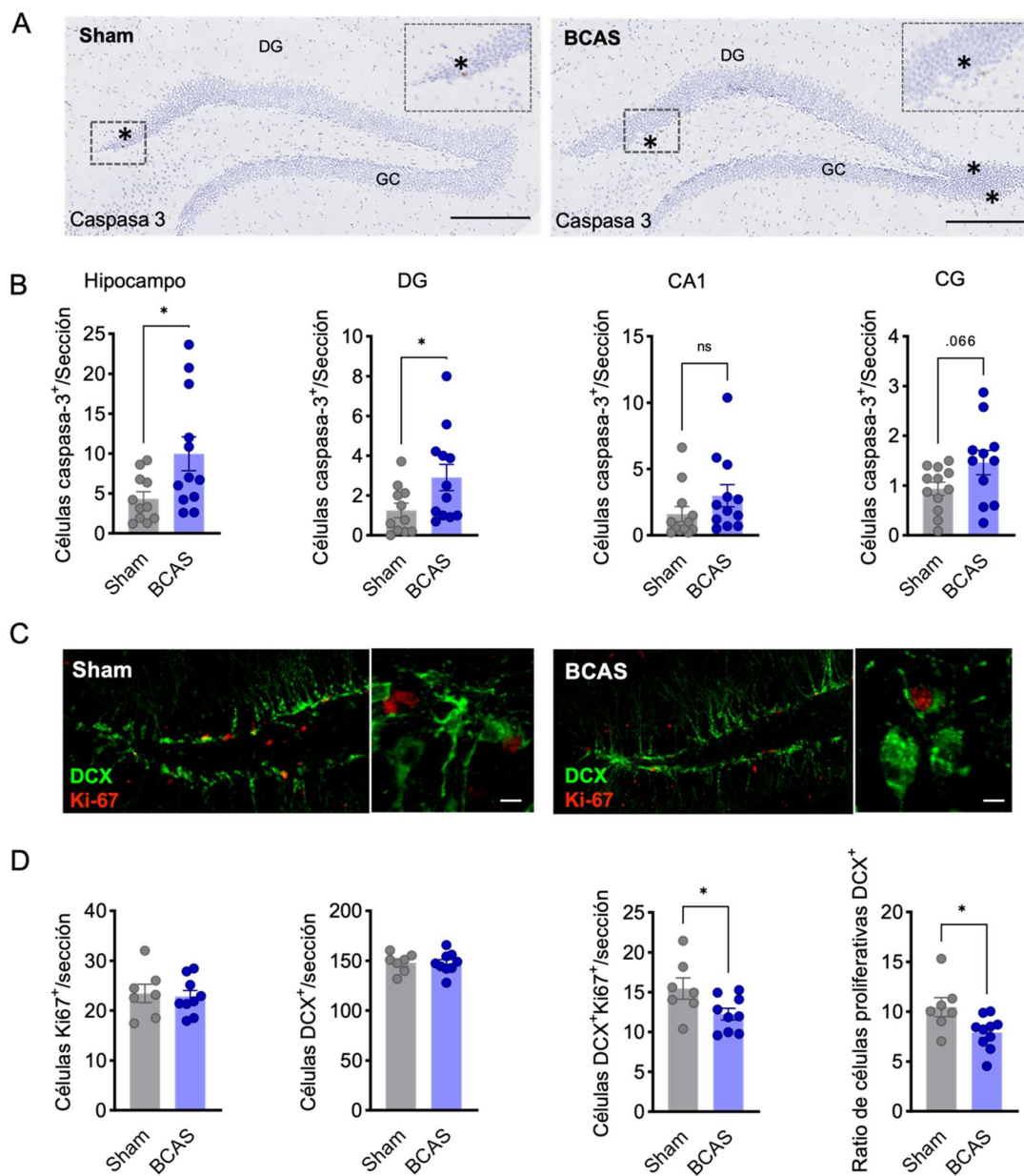


Figura 19. Estudio de la neurogénesis hipocámpal adulta en animales sometidos a hipoperfusión crónica. (A) Imágenes representativas del marcaje con DCX (verde) en el giro dentado, marcaje nuclear con DAPI (azul). (B) Cuantificación del número de células DCX<sup>+</sup> (neuroblastos) en la capa granular. Análisis estadístico mediante *t* de Student.  $n=11-16$  \* $p<0.05$ . (C) Cuantificación del área DCX<sup>+</sup> en la capa molecular normalizada por el área total DCX<sup>+</sup>. Análisis estadístico mediante *U* de Mann-Whitney.  $n=4-5$  \* $p<0.05$ . (D) Imágenes representativas de alta resolución del marcaje DCX (verde). Barra de escala = 15μm. (E) Evaluación de la longitud de la dendrita apical. Izquierda: media por animal. Derecha: conjunto de dendritas cuantificadas por condición sham o BCAS. (F) Gráfico de sectores mostrando la distribución de las dendritas apicales entre cortas, medianas y largas. Datos representados como media  $\pm$  SEM y analizados mediante *U* de Mann-Whitney.  $n=6-8$  \* $p<0.05$ .

### 1.3.2 Efecto de la hipoperfusión cerebral sobre la apoptosis en el hipocampo

Como posible mecanismo para explicar la reducción en el número de neuroblastos en ratones BCAS evaluamos, en primer lugar, si la hipoperfusión afectaba la supervivencia celular tres meses tras el inicio de la hipoperfusión. Efectivamente, los ratones con BCAS presentaron un mayor número de células caspasa-3<sup>+</sup> en el hipocampo, y particularmente en el DG, en comparación con el grupo sham a los tres meses después de la inducción de BCAS, y una tendencia hacia un aumento en la CG (Fig. 20 A-B). Esto sugiere un incremento en la apoptosis inducida por BCAS en áreas donde tiene lugar la neurogénesis, y sugiere que la reducción en la supervivencia celular podría ser partícipe en la disminución en el número de nuevas neuronas debida a la hipoperfusión.



*Figura 20. Evaluación de los mecanismos subyacentes a los cambios neurogénicos observados tras tres meses de hipoperfusión. (A) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica con caspasa-3 en el giro dentado tres meses después de la implantación de los microcoils. Barras de escala = 250  $\mu$ m y 50  $\mu$ m. (B) Cuantificación del número de células caspasa-3<sup>+</sup> (apoptóticas) en el hipocampo, CA1, DG y CG, n=11-12. (C). Imágenes representativas de la inmunofluorescencia con DCX (verde) y Ki67 (rojo) en el giro dentado de ratones sometidos a hipoperfusión durante 1 mes. Barras de escala = 80  $\mu$ m y 15  $\mu$ m. (D) Cuantificación en la capa granular del número de células Ki67<sup>+</sup> (proliferativas), DCX<sup>+</sup> (neuroblastos), DCX<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> (neuroblastos proliferativos) y de la ratio de neuroblastos proliferativos por células en proliferación. Datos representados como media  $\pm$  SEM y analizados mediante t de Student de dos colas n=7-9 \*p<0.05.*

### 1.3.3 Efecto de la hipoperfusión cerebral sobre la proliferación de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo

Además, también investigamos si la tasa de proliferación se veía afectada mediante el análisis de células Ki67<sup>+</sup> un mes después de la estenosis. Llamativamente, aunque no se encontraron diferencias en el número total de células Ki67<sup>+</sup> ni DCX<sup>+</sup> tras 1 mes en el DG, sí observamos una reducción significativa en el número de células DCX proliferativas y en la proporción de células DCX<sup>+</sup>-Ki67<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> en el grupo BCAS (Fig. 20 C-D). Esto apoya que la hipoperfusión promueve una disminución en la tasa de proliferación de neuroblastos, lo cual podría explicar, junto con el aumento en la apoptosis, la disminución de la neurogénesis en los ratones con BCAS a lo largo del tiempo.

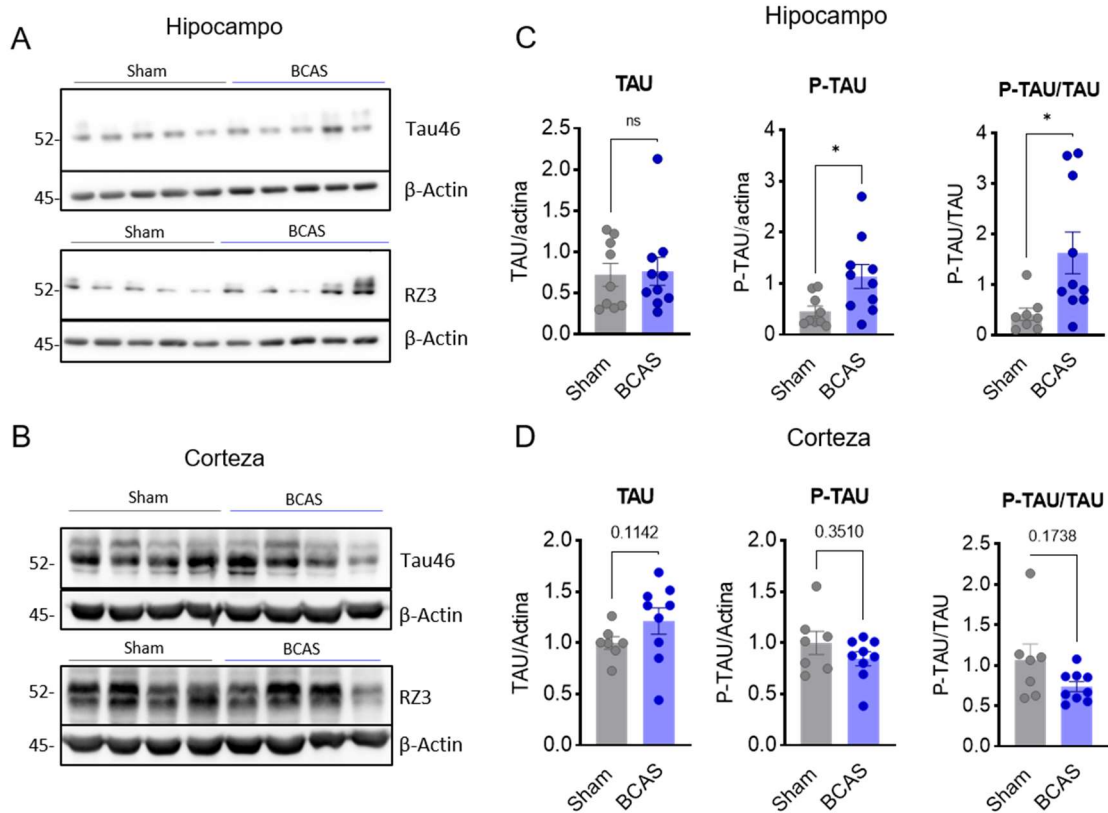
En conjunto, estos datos respaldan la idea de que tanto el aumento en la apoptosis como la disminución en la tasa de proliferación contribuyen a la alteración cuantitativa de la neurogénesis en los ratones sometidos a hipoperfusión.

## **1.4 Evaluación de la implicación de los signos histopatológicos típicos de la enfermedad de Alzheimer en el efecto producido por la hipoperfusión cerebral crónica inducida por BCAS**

A la luz de los datos obtenidos nos preguntamos qué factores y sustratos histopatológicos podían estar afectando a las neuronas del hipocampo, contribuyendo a las alteraciones de la memoria. Recientemente, Faraco y colaboradores describieron como en un modelo de dieta alta en sal en el que se producía hipoperfusión cerebral crónica se generaba un incremento de P-TAU que era el posible responsable del déficit cognitivo hallado por estos investigadores (Faraco et al., 2019). Por ello, decidimos explorar la relación entre el modelo BCAS y la EA, especialmente centrados en sus efectos sobre la fosforilación de TAU y en su capacidad para potenciar los signos histopatológicos de la demencia de Alzheimer.

### 1.4.1 Efecto de la hipoperfusión cerebral sobre la fosforilación de TAU

Se realizó un primer estudio para comprobar si la fosforilación de TAU estaba o no incrementada en nuestro modelo y si esta dependía de la región que se estudiase. Los resultados indicaron que la hipoperfusión inducida por los *microcoils* era capaz de incrementar la fosforilación de TAU tras tres meses, y específicamente en el hipocampo (Fig. 21 A). Aunque en la corteza se observó una tendencia, esta no resultó ser estadísticamente significativa (Fig. 21B).



**Figura 21.** Estudio de la fosforilación de TAU causada por la hipoperfusión crónica mediante anticuerpo 44-768G. (A,B) Imagen de los western-blot anti-TAU (44-768G) tras 3 meses de hipoperfusión en animales de 5 meses de edad. (A) Western-blot de hipocampo. (B) Western-blot de corteza. (C,D) Cuantificación de los western-blot (de izquierda a derecha) para TAU total, P-TAU y la ratio TAU/P-TAU. La actina se utilizó como control de carga, salvo en las ratios. (C) Western-blot de muestras de hipocampo tras tres meses de hipoperfusión,  $n=10$ . (D) Western-blot de muestras de corteza tras tres meses de hipoperfusión,  $n=7-9$ . Datos representados como media  $\pm$  SEM y analizados mediante  $t$  de Student o  $U$  de Mann-Whitney según se ajustaron a los parámetros de normalidad. \* $p<0.05$ ; ns: no significativo.

Con el fin de corroborar el resultado obtenido y profundizar en la relación entre el daño hipocampal y el incremento de P-TAU, se utilizó un nuevo anticuerpo para P-TAU más específico de la fosforilación de los residuos más frecuentemente asociados con el hipocampo (AT8). Los resultados con el nuevo anticuerpo confirmaron lo ya observado. El incremento en P-TAU y en la ratio de la fosforilación de TAU (Fig. 22) fueron específicos de

la región hipocampal. Ello corrobora la posible relación entre la fosforilación de TAU y el daño hipocampal, así como el deterioro cognitivo dependiente del hipocampo.

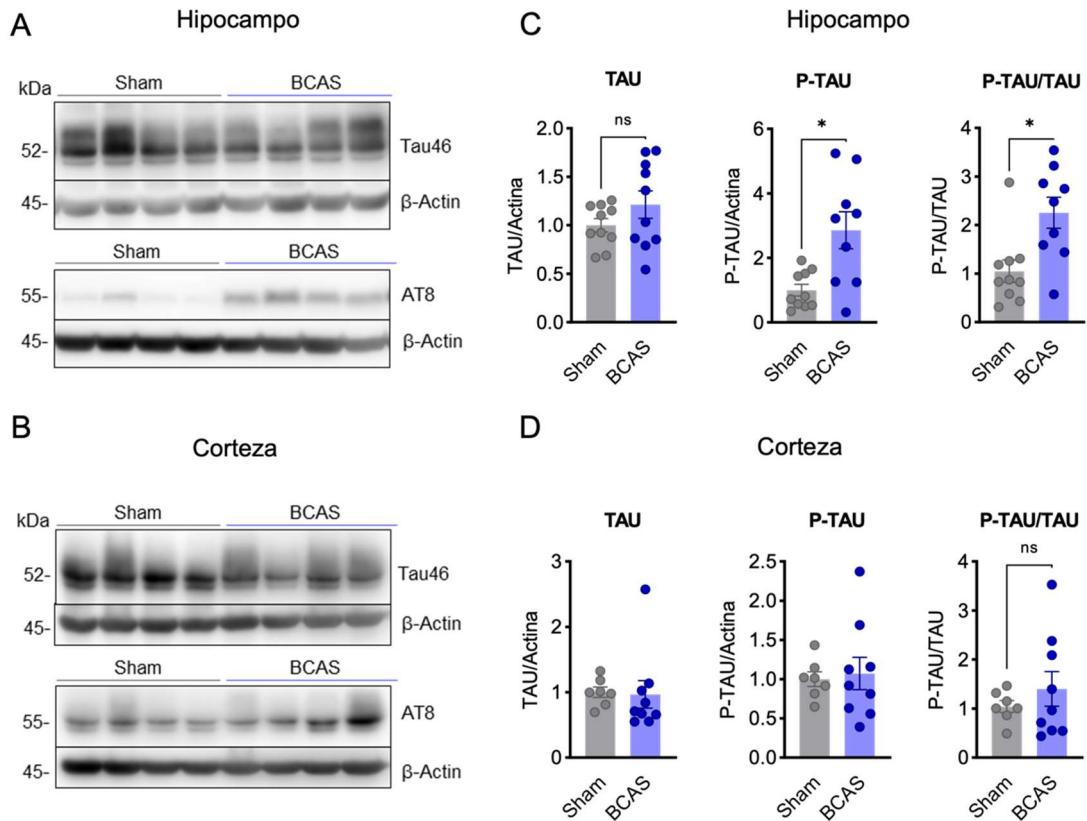


Figura 22. Estudio de la fosforilación de TAU causada por la hipoperfusión crónica mediante anticuerpo AT8. (A,B). (A,B) Imagen de los western-blot anti-TAU (AT8) tras 3 meses de hipoperfusión en animales de 5 meses de edad. (A) Western-blot de hipocampo. (B) Western-blot de corteza. (C,D) Cuantificación de los western-blot (de izquierda a derecha) para TAU total, P-TAU y la ratio TAU/P-TAU. La actina fue utilizada como control de carga salvo en las ratios. (C) Western-blot de muestras de hipocampo tras tres meses de hipoperfusión,  $n=10$ . (D) Western-blot de muestras de corteza tras tres meses de hipoperfusión,  $n=7-9$ . Datos representados como media  $\pm$  SEM y analizados mediante  $t$  de Student o  $U$  de Mann-Whitney según se ajustaron a los parámetros de normalidad. \* $p<0.05$ , ns: no significativo.

#### 1.4.2 Estudio de la hipoperfusión crónica como factor coadyuvante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

Decidimos profundizar en la relación entre la demencia de Alzheimer, inicialmente descrita como una enfermedad vascular, y la hipoperfusión crónica producida por BCAS. Para ello sometimos a la cirugía BCAS a los ratones modelo de la EA APP<sup>NL-F</sup> de doce meses de edad y los sacrificamos con quince meses. De este modo estudiamos la posible contribución de la hipoperfusión crónica para agravar algunos de los hitos histopatológicos de esta

demencia. Para ello exploramos la fosforilación de TAU y el desarrollo de placas de  $\beta$ -amiloide en nuestro modelo  $APP^{NL-F}$ , con o sin estenosis de las arterias carótidas.

Debido a que las placas de amiloide se ubican principalmente en la corteza en nuestro modelo de Alzheimer ( $APP^{NL-F}$ ), comenzamos explorando la fosforilación de TAU en esta región. Hallamos así que la ratio de P-TAU/TAU se encontraba incrementado en animales BCAS respecto a los animales sham tras tres meses de hipoperfusión (Fig. 23).

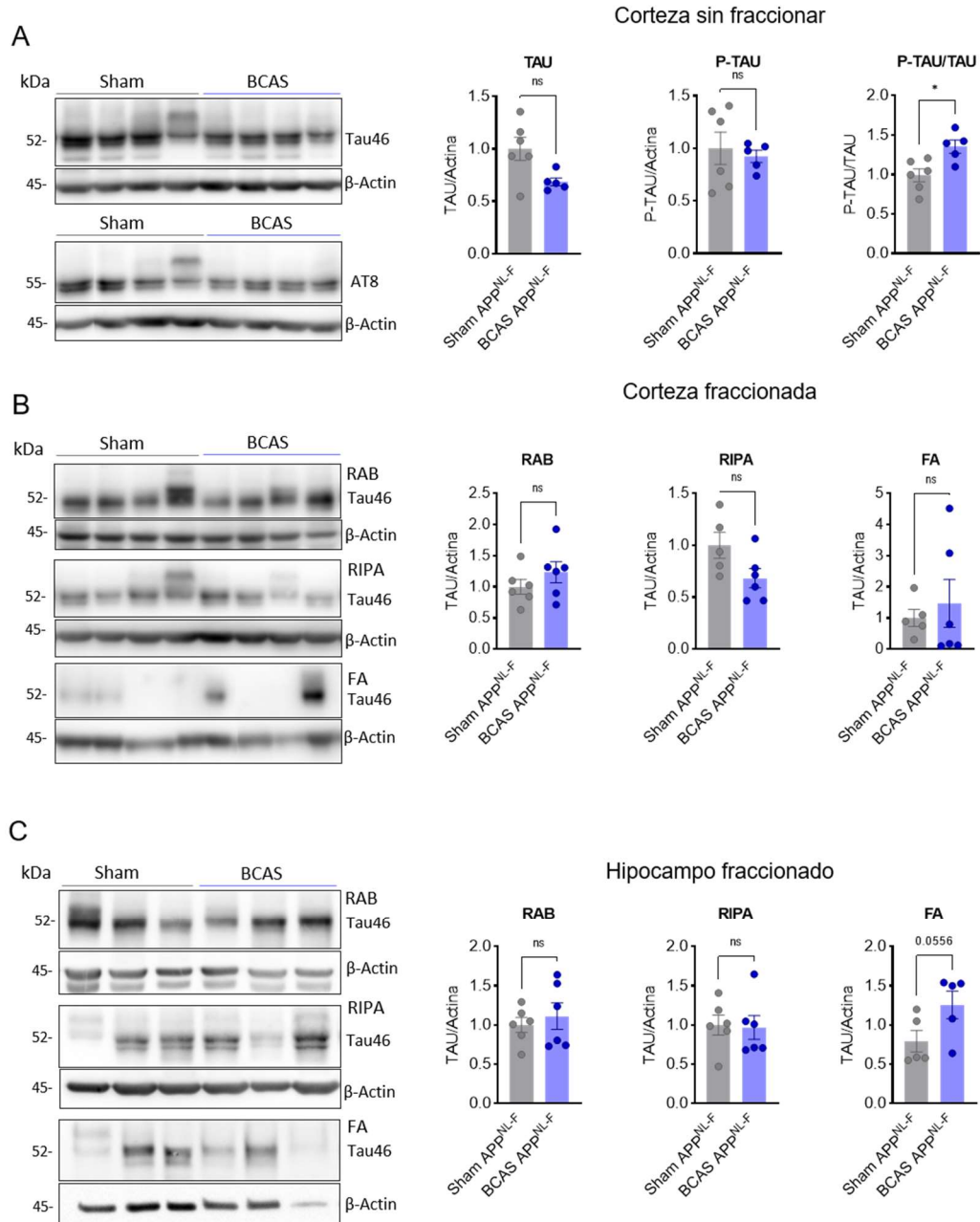


Figura 23. Estudio de la fosforilación y solubilidad de TAU causada por la hipoperfusión crónica en el modelo de la enfermedad de Alzheimer  $APP^{NL-F}$ . (A) Cuantificación del western-blot (de izquierda a derecha) para TAU total, P-TAU y la ratio TAU/P-TAU en cortezas de animales  $APP^{NL-F}$  de 15 meses de edad. La actina fue utilizada como control de carga salvo en las ratios. (B) Western-blot contra TAU de muestras de corteza separadas en fracción soluble (RAB) y (RIPA)

*e insoluble (FA) tras tres meses de hipoperfusión. (C) Western-blot contra TAU de muestras de hipocampo separadas en fracción soluble (RAB) y (RIPA) e insoluble (FA) tras tres meses de hipoperfusión. Datos representados como media  $\pm$  SEM y analizados mediante t de Student o U de Mann-Whitney según se ajustaron a los parámetros de normalidad, n=5-6 \*p<0.05 ns: no significativo.*

Decidimos profundizar en el estudio de TAU analizando ya no su fosforilación sino su solubilidad, que es crítica en el desarrollo de las tauopatías (Bussian et al., 2018; Koike et al., 2011) así como en la ulterior formación de ovillos neurofibrilares. Para ello, se fraccionaron las muestras de corteza e hipocampo y se cuantificó la proteína TAU en disolventes con diferente solubilidad para las proteínas. Nuestros resultados muestran que la cantidad de TAU en la fracción más insoluble aumentaba en animales sometidos a tres meses de hipoperfusión, y que este efecto fue específico del hipocampo (Fig. 23). Estos datos, conjuntamente, indican que la hipoperfusión puede ser un factor relevante como coadyuvante de la tauopatía asociada a la enfermedad de Alzheimer, incrementando la fosforilación de TAU en la corteza y aumentando la cantidad de TAU insoluble en el hipocampo.

A continuación, comprobamos si la hipoperfusión crónica podría tener un efecto en la formación de placas de A $\beta$ . Así, medimos el tamaño, número y superficie positiva de las placas amiloides reconocidas por un anticuerpo específico anti-A $\beta$ , así como mediante la tinción con tioflavina que marca las placas compactas o densas. Al analizar las placas densas, hallamos que la hipoperfusión induce un incremento en el área positiva marcada por tioflavina, así como una fuerte tendencia al aumento del tamaño de los núcleos densos ThioS<sup>+</sup> (Fig. 24). Por su parte el tamaño de las placas A $\beta$ <sup>+</sup> también se vio incrementado debido a la hipoperfusión, al igual que la superficie positiva, aunque no sucedió lo mismo con su número (Fig. 24).

Finalmente se realizaron algunos estudios comportamentales en los animales modelo de la enfermedad de Alzheimer sometidos a hipoperfusión para evaluar su posible efecto sobre el deterioro cognitivo de estos ratones. Se recurrió a las pruebas SAP y de brazo cerrado en el laberinto en Y a la prueba NOL para evaluar la memoria espacial de trabajo con el primero y de referencia con el segundo y tercero. Respecto a la evaluación de la memoria espacial de trabajo, no se encontraron diferencias entre los animales sometidos a hipoperfusión y sus correspondientes animales sham a ninguno de los tiempos testados mediante la prueba SAP (Fig. 25). Cuando se evaluó la memoria de referencia espacial, tampoco hubo diferencias en los índices de reconocimiento o discriminación de la nueva localización del objeto o del brazo que había estado cerrado entre ambos grupos experimentales (Fig. 25). Sin embargo, los animales sham tampoco lograron reconocerlos, por lo que no podemos concluir si realmente no existe un deterioro en este dominio cognitivo debido a la hipoperfusión o si la

ausencia de diferencias se debe a un error en el diseño, realización de las pruebas y/o su complejidad para animales de edad avanzada.

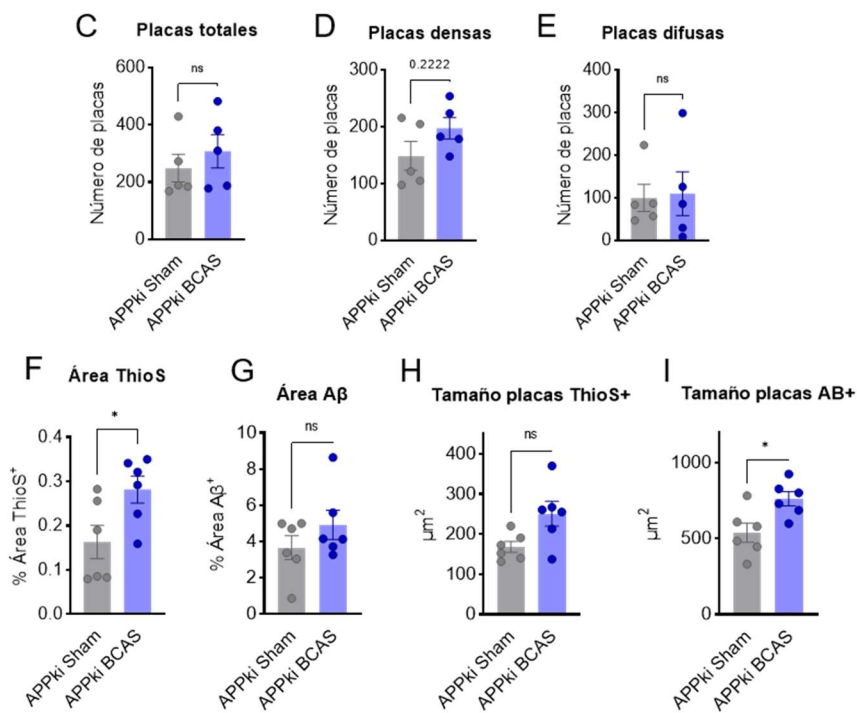
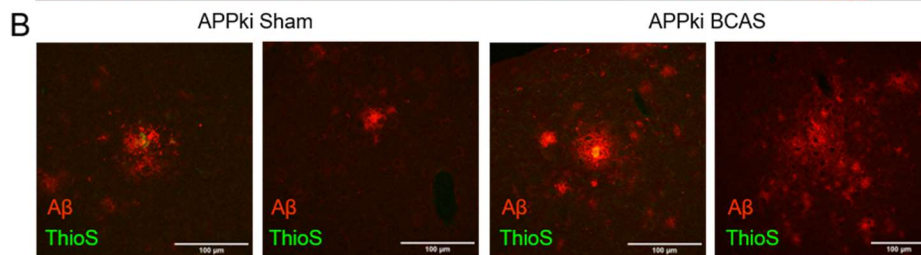
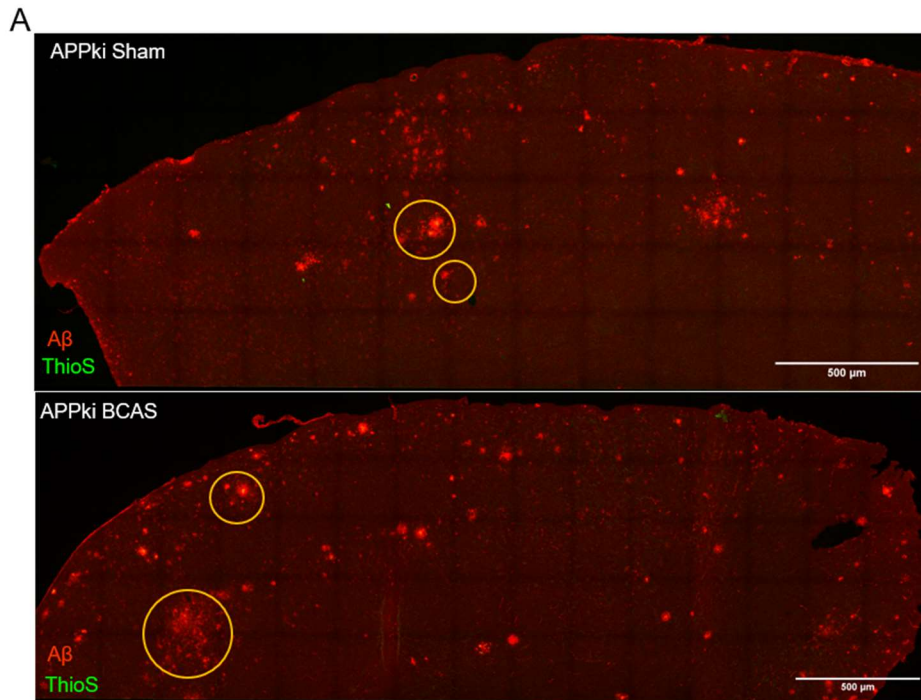
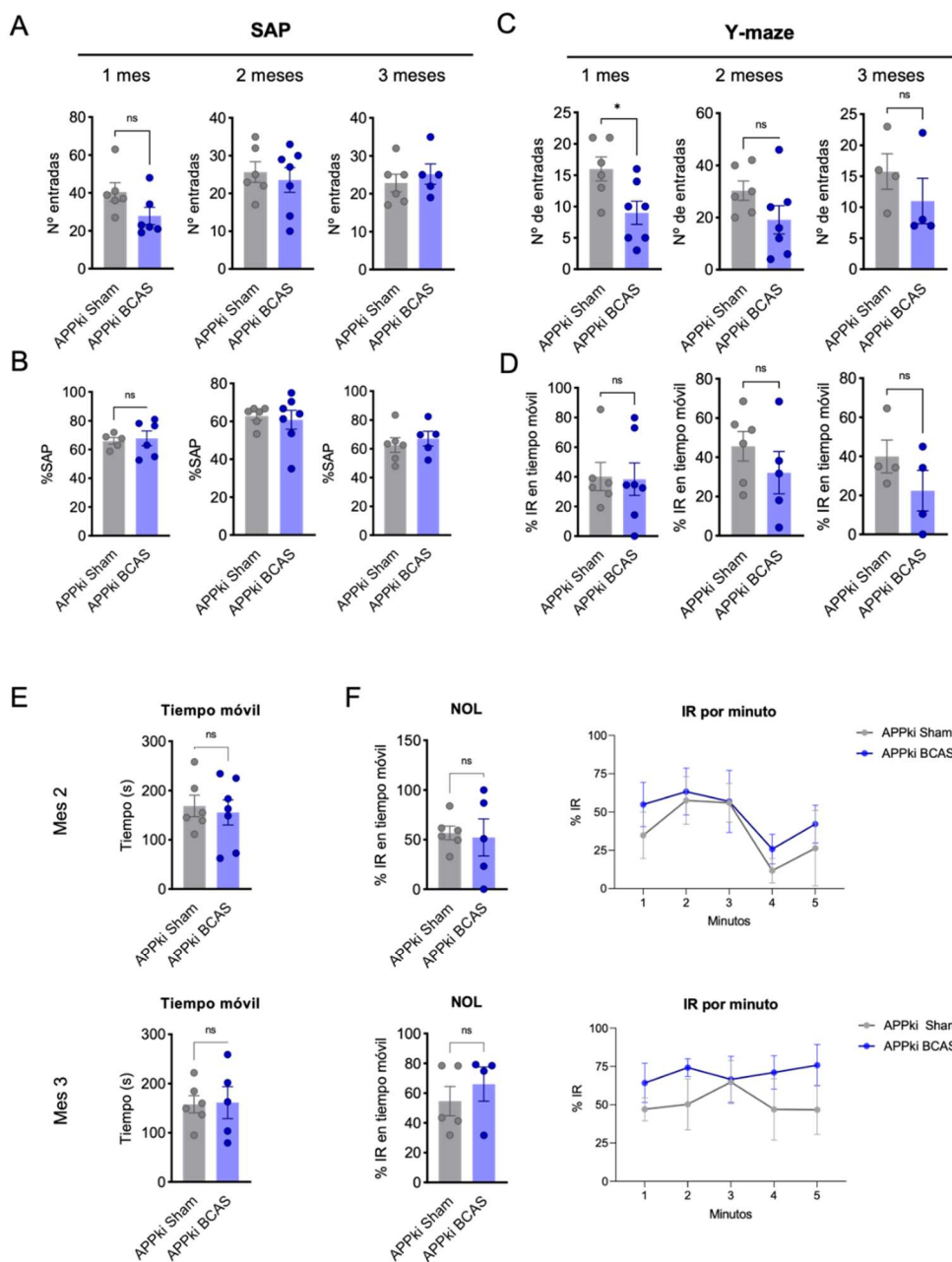


Figura 24. Evaluación del desarrollo de las placas amiloides en el modelo  $APP^{NL-F}$  tras tres meses de hipoperfusión. (A) Imágenes representativas del marcaje con anti- $A\beta$  (rojo) y tioflavinaS (verde) en la corteza tres meses después de la implantación de los microcoils. Barra de escala = 100  $\mu$ m. (B) Detalle de placas difusas y densas representativas para cada condición (sham o BCAS). (C-I) Cuantificación del número y tamaño de las placas y la superficie positiva para  $A\beta$  y ThioS comparando los animales BCAS con los sometidos a la cirugía simulada tres meses después de la operación en animales  $APP^{NL-F}$  de 15 meses de edad. (C) Número de placas totales ( $A\beta^+$ ThioS $^{+/-}$ ). (D) Número de placas densas (ThioS $^+$ ). (E) Número de placas difusas ( $A\beta^+$ ThioS $^-$ ). (F) Área positiva para ThioS (G) Área positiva para  $A\beta$ . (H) Tamaño de placas ThioS $^+$ . (I) Tamaño de las placas  $A\beta^+$ . Datos representados como media  $\pm$  SEM y analizados mediante t de Student de dos colas  $n=5$  \* $p<0.05$  ns: no significativo.



*Figura 25. Evaluación cognitiva de la memoria espacial de trabajo y de referencia de los animales APP<sup>NL-F</sup> sometidos a hipoperfusión, 1, 2 y 3 meses tras la cirugía. (A,B) Prueba SAP para evaluar la memoria espacial de trabajo basada en la alternancia espontánea al recorrer el laberinto en Y. (A) Número de entradas totales a los brazos realizadas por los ratones. (B) Porcentaje de alternancias espontáneas. (C,D) Análisis de la prueba del brazo cerrado/abierto en el laberinto en Y para evaluar la memoria espacial de referencia. (C) Número de entradas totales a los brazos. (D) Cuantificación del índice de reconocimiento del brazo cerrado basado en el tiempo móvil en los brazos. (E,F) Análisis del test NOL para la evaluación de la memoria espacial de referencia. (E) Representación del tiempo móvil en la arena de ambos grupos experimentales. (F) Cuantificación del índice de reconocimiento de la nueva localización de objeto, a la izquierda en total y a la derecha por minuto. Datos representados como media  $\pm$  SEM y analizados mediante t de Student de dos colas n=4-6 \*p<0.05 ns: no significativo.*

## 2. Estudio de las consecuencias del consumo elevado de sodio en la dieta sobre la función cognitiva y la homeostasis hipocampal

Para investigar los efectos fisiopatológicos del modelo de dieta alta en sodio (HSD), se llevó a cabo una caracterización fenotípica inicial de dicho modelo. A continuación, se examinaron varios dominios cognitivos, la función y la homeostasis del hipocampo y se abordaron los demás objetivos propuestos.

### 2.1 Descripción del modelo murino de dieta alta en sal

#### 2.1.1 Estudio del efecto de una dieta alta en sal (4% NaCl) sobre la presión sanguínea del ratón

Antes de comenzar a explorar el modelo en mayor profundidad, comprobamos si la presión sanguínea podría estar afectada por el consumo elevado de  $\text{Na}^+$ . Encontramos una elevación en la presión arterial media en el grupo de 5 semanas de consumo de dieta alta en sal (Fig. 26). Aunque el aumento de la presión sanguínea resultó significativo estos parámetros se encuentran dentro de los valores fisiológicos murinos (90-110 mmHg). Por lo que, aunque la dieta incrementó la presión sanguínea, dicho aumento no resultó suficiente como para categorizar a nuestro modelo como uno de hipertensión.

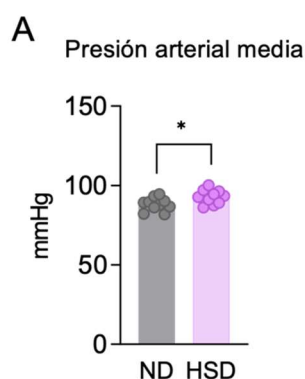


Fig. 26. Medida de la presión arterial media tras 5 semanas de dieta alta en sodio. Unidad: milímetros de mercurio. Datos representados como media  $\pm$  SEM; se compararon las medias mediante la t de Student.  $n=10$   $*p<0.05$ .

#### 2.1.2 Análisis del impacto de una dieta alta en sodio sobre la perfusión cerebral

Debido a que estudios previos en la literatura apuntan a una hipoperfusión cerebral derivada de dietas altas en sal, exploramos esta posibilidad en nuestro propio modelo. Tras 5 semanas de dieta 4% NaCl, no detectamos disminución del flujo sanguíneo en ninguna de las regiones estudiadas (Fig. 27 B), si bien sorprendentemente hallamos un incremento en el

flujo sanguíneo cerebral específico del tálamo. Al repetir el estudio tras 10 semanas de dieta, punto temporal más próximo a los datos publicados en la literatura, descubrimos una reducción significativa de la perfusión cerebral en el tálamo y tendencias descendentes en el hipocampo y en el flujo sanguíneo cerebral total (Fig. 27 D).

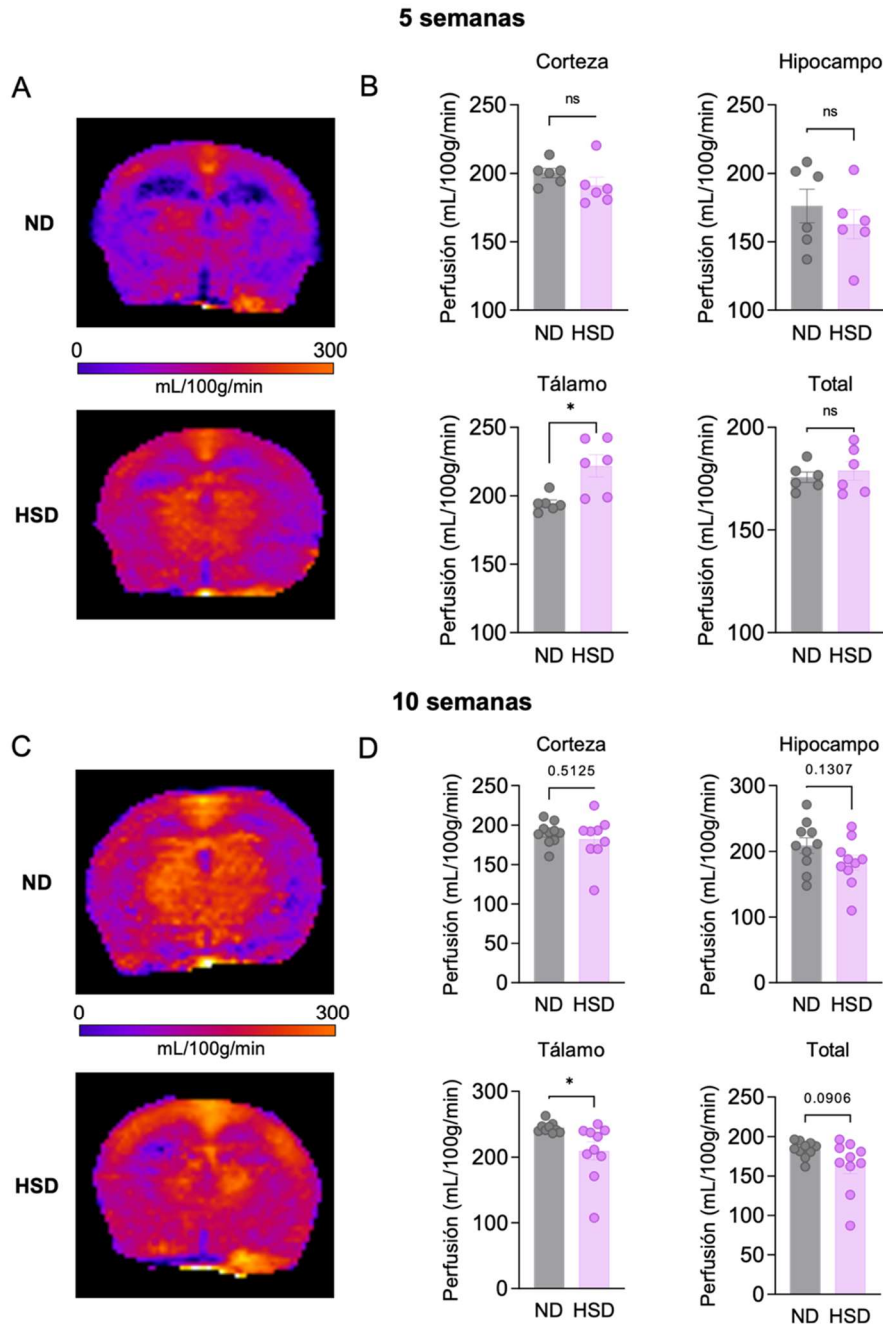


Fig. 27. Evaluación del flujo sanguíneo cerebral mediante ASL en el modelo de HSD. (A) Mapas ASL representativos del flujo sanguíneo cerebral tras 5 semanas de ND o HSD. (B) Cuantificación de la perfusión cerebral tras 5 semanas de dieta en corteza, hipocampo, tálamo y flujo total.  $n=10$ . (C) Mapas ASL representativos del flujo sanguíneo cerebral tras 10 semanas de ND o HSD (D) Cuantificación de la perfusión cerebral tras 10 semanas de dieta en corteza, hipocampo, tálamo y flujo total.  $n=10$ . Datos representados como media  $\pm$  SEM, se compararon las medias

mediante la *t* de Student, excepto para el tálamo a 10 semanas que no cumplía los parámetros de normalidad y se utilizó la *U* de Mann-Whitney. \* $p < 0.05$ , ns: no significativo.

### 2.1.3 Efectos hematológicos y bioquímicos del consumo elevado de sal en la dieta

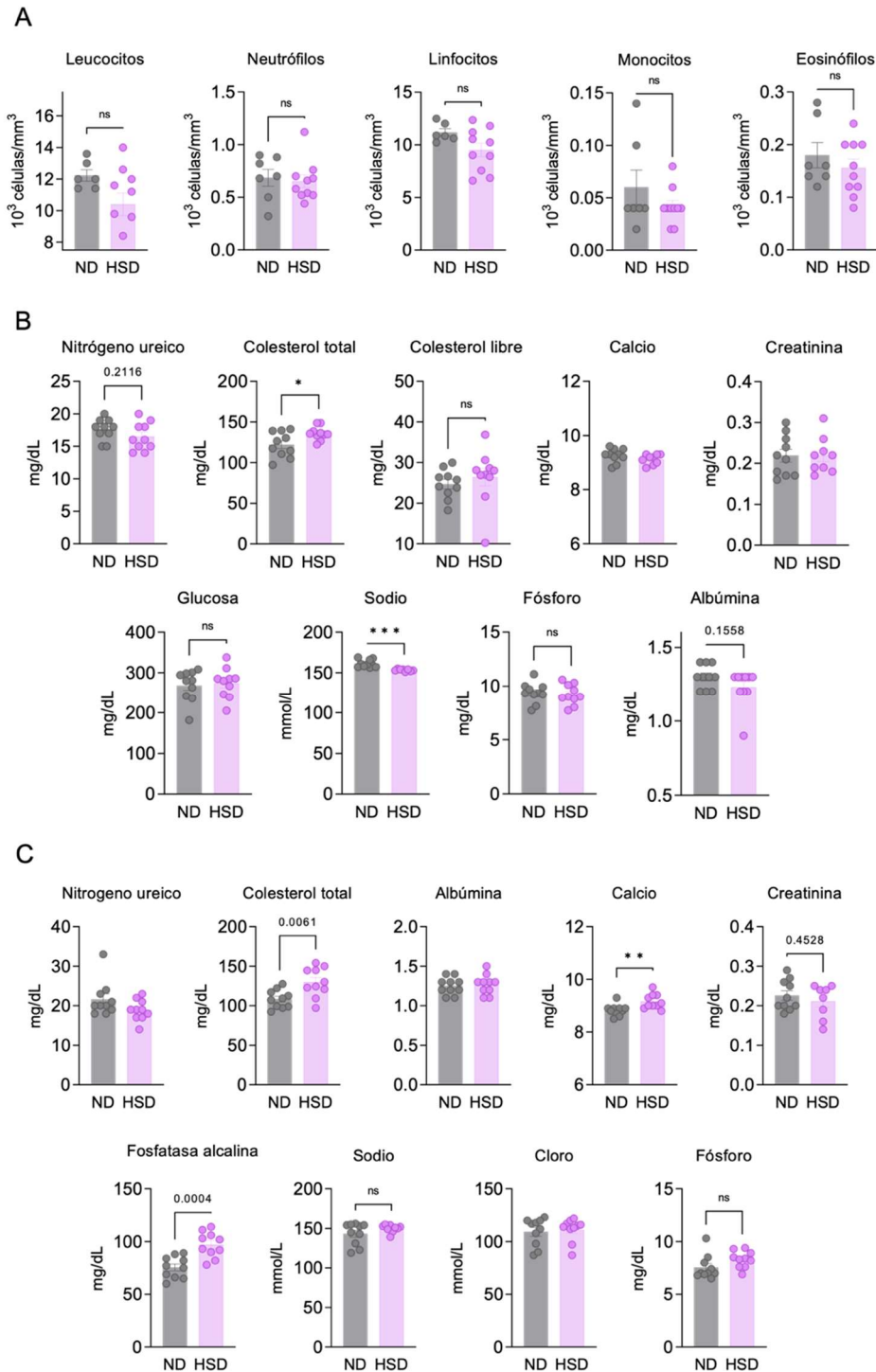
Inicialmente realizamos una hematología de los ratones tras 5 semanas de HSD y sus correspondientes controles ND. No encontramos diferencias significativas en los valores celulares sanguíneos tras 5 semanas de dieta 4% NaCl (Fig. 28A).

Posteriormente hicimos una valoración de los parámetros bioquímicos del plasma tras 10 semanas de HSD. Hallamos un incremento en el colesterol total en ratones sometidos a dieta alta en sodio en comparación los animales de dieta normal (Fig. 28B) y una inesperada reducción en el sodio plasmático en estas mismas condiciones.

Con el fin de establecer si estos cambios eran robustos en el tiempo volvimos a analizar estos parámetros (y añadimos fosfatasa alcalina y  $Cl^-$ ) tras 25 semanas de dieta alta en sal. Hallamos incrementos significativos debido a una HSD no solo en el colesterol total, como habíamos visto previamente, sino también en la fosfatasa alcalina, en las proteínas totales, y el calcio (Fig. 28C). Los niveles de sodio parecieron estabilizarse puesto que no hallamos diferencias significativas entre los ratones controles y los HSD.

### 2.1.4 Efecto de una dieta alta en sodio sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado una alteración de la barrera hematoencefálica tras 5 semanas de dieta alta en sodio (Violeta Medina, Tesis Doctoral), por lo que nos preguntamos si esta disfunción de la barrera podría mantenerse en el tiempo. Determinando la extravasación de un dextrano de bajo peso molecular comprobamos la permeabilidad de la BHE tras 10 semanas de consumo elevado de sal en la dieta. Así nuestros datos muestran que también en este punto temporal la barrera hematoencefálica se encuentra alterada, lo que se manifiesta en un aumento de su permeabilidad (Fig. 29).



*Fig. 28. Seguimiento de los parámetros hematológicos y bioquímicos en el modelo de dieta alta en sodio. (A) Hematología tras 5 semanas de HSD, los valores estudiados fueron: número total de linfocitos, número de neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos. n=10. (B) Análisis de parámetros bioquímicos de plasma de ratón sometido durante 10 semanas a una dieta alta en sodio. Los valores estudiados fueron: nitrógeno ureico, colesterol total, colesterol libre, calcio, creatinina, glucosa, sodio, fósforo y albúmina. n=10. (C) Análisis de parámetros bioquímicos de plasma de ratón tras 25 semanas de dieta alta en sodio. Los valores estudiados fueron: nitrógeno*

ureico, colesterol total, calcio, creatinina, proteínas totales, fosfatasa alcalina, sodio, fósforo, cloro y albúmina.  $n=10$ . Datos representados como media  $\pm$  SEM, se compararon las medias mediante la *t* de Student.  $*p<0.05$ .

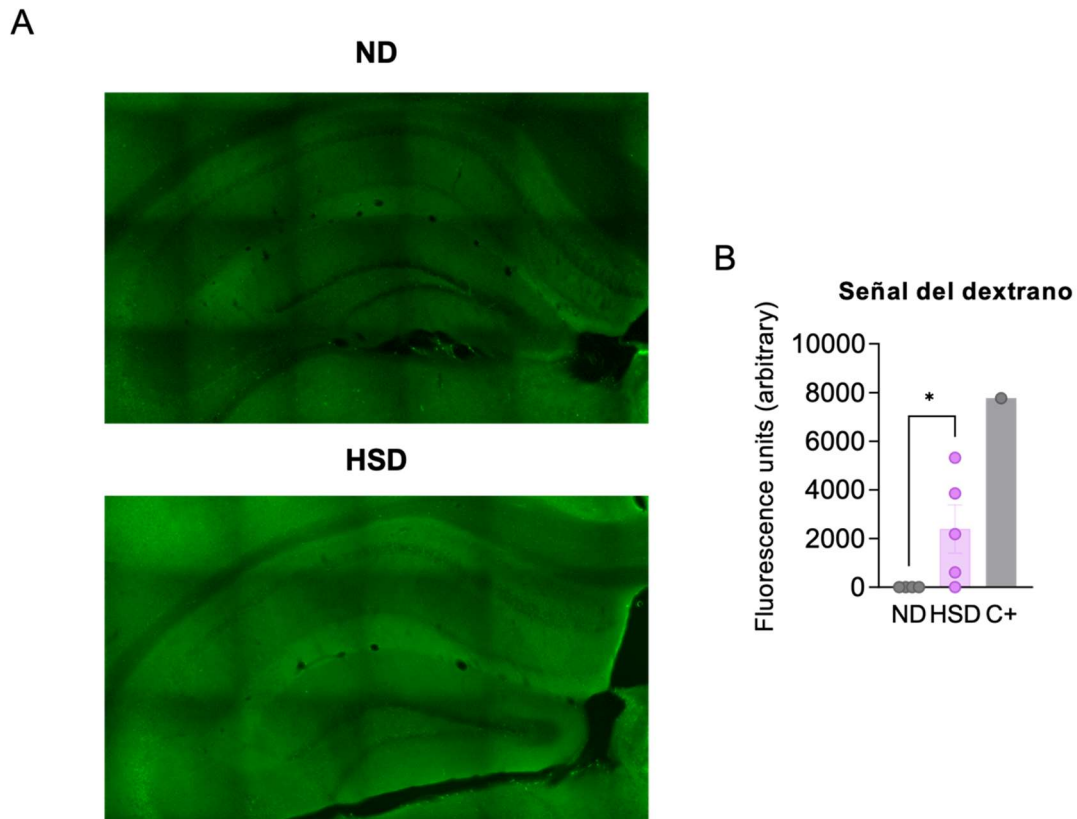


Fig. 29. Estudio de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el modelo HSD. Se utilizó la extravasación de un dextrano fluorescente de 70kDa para estimar la permeabilidad de la barrera. (A) Imágenes representativas de la microfotografía de fluorescencia para el dextrano empleado. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del canal verde en el hipocampo. Las unidades son arbitrarias. El control positivo utilizado fue un animal con ictus hemorrágico en la fase aguda y medido en la zona del infarto.  $n=5$ . Datos representados como media  $\pm$  SEM, se compararon los rangos mediante la *U* de Mann-Whitney.  $*p<0.05$ .

## 2.2 Evaluación del efecto de la HSD sobre la función cognitiva

### 2.2.1 Efecto de 5 semanas de HSD en la memoria episódica y en la memoria espacial de trabajo

En primer lugar, procedimos a confirmar los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con anterioridad utilizando un protocolo retrógrado del test de condicionamiento al miedo contextual (CFC, del inglés *contextual fear conditioning*) tras 5 semanas de dieta. De este modo, en la evaluación de la memoria episódica reproducimos nuestros experimentos previos y hallamos un déficit de este tipo de memoria manifestado por una disminución de la respuesta de *freezing* o inmovilidad total (Fig. 30 A).

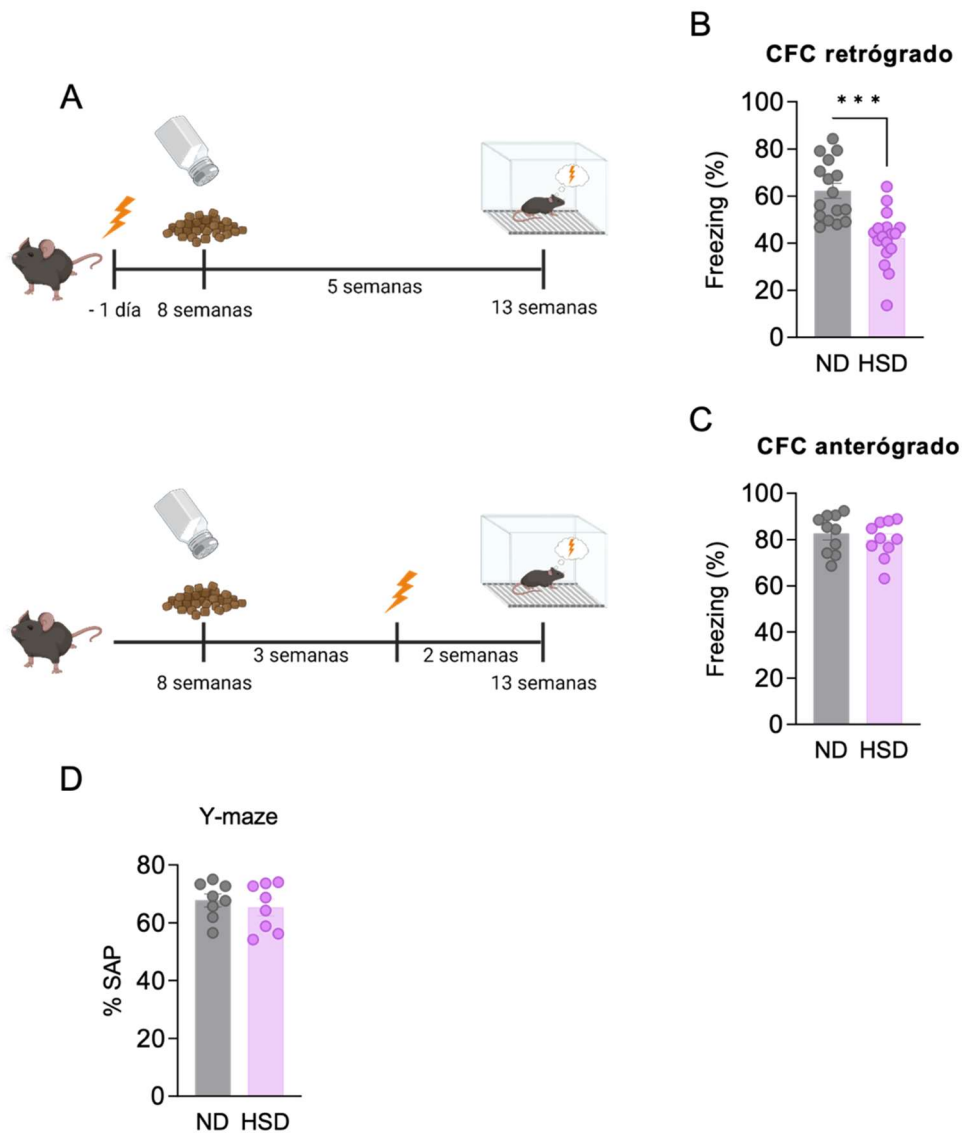


Fig. 30. Evaluación cognitiva de los ratones con una dieta alta en sal durante 5 semanas. (A) Diseño experimental de los CFCs retrógrado y anterógrado en el modelo de 5 semanas de HSD. (B) Respuesta de freezing en un diseño retrógrado de la prueba CFC durante la fase de retrieval.  $n=16-17$ . (C) Respuesta de freezing en un diseño anterógrado de la prueba CFC durante la fase de retrieval.  $n=10$ . (D) Cuantificación del porcentaje de alternancias espontáneas durante la exploración del laberinto en Y. Datos representados como media  $\pm$  SEM; se compararon las medias mediante la  $t$  de Student.  $*p < 0.05$ .

Asimismo, evaluamos este mismo test, pero de un modo anterógrado, realizando el condicionamiento tres semanas después del comienzo de la dieta y el *retrieval* 2 semanas después. Con este diseño experimental, no hallamos diferencias entre la respuesta de *freezing* de los animales con dieta normal y dieta alta en sal (Fig. 30 B). Finalmente, para este punto temporal, comprobamos la memoria espacial de trabajo mediante la prueba de alternancias espontáneas en el laberinto en Y. Los ratones control y sometidos a dieta alta en sodio realizaron un porcentaje de alternancias espontáneas muy similar (Fig. 30 C), por

lo que no encontramos déficits en este tipo de memoria mediante el uso de esta prueba tras 5 semanas de dieta alta en sal.

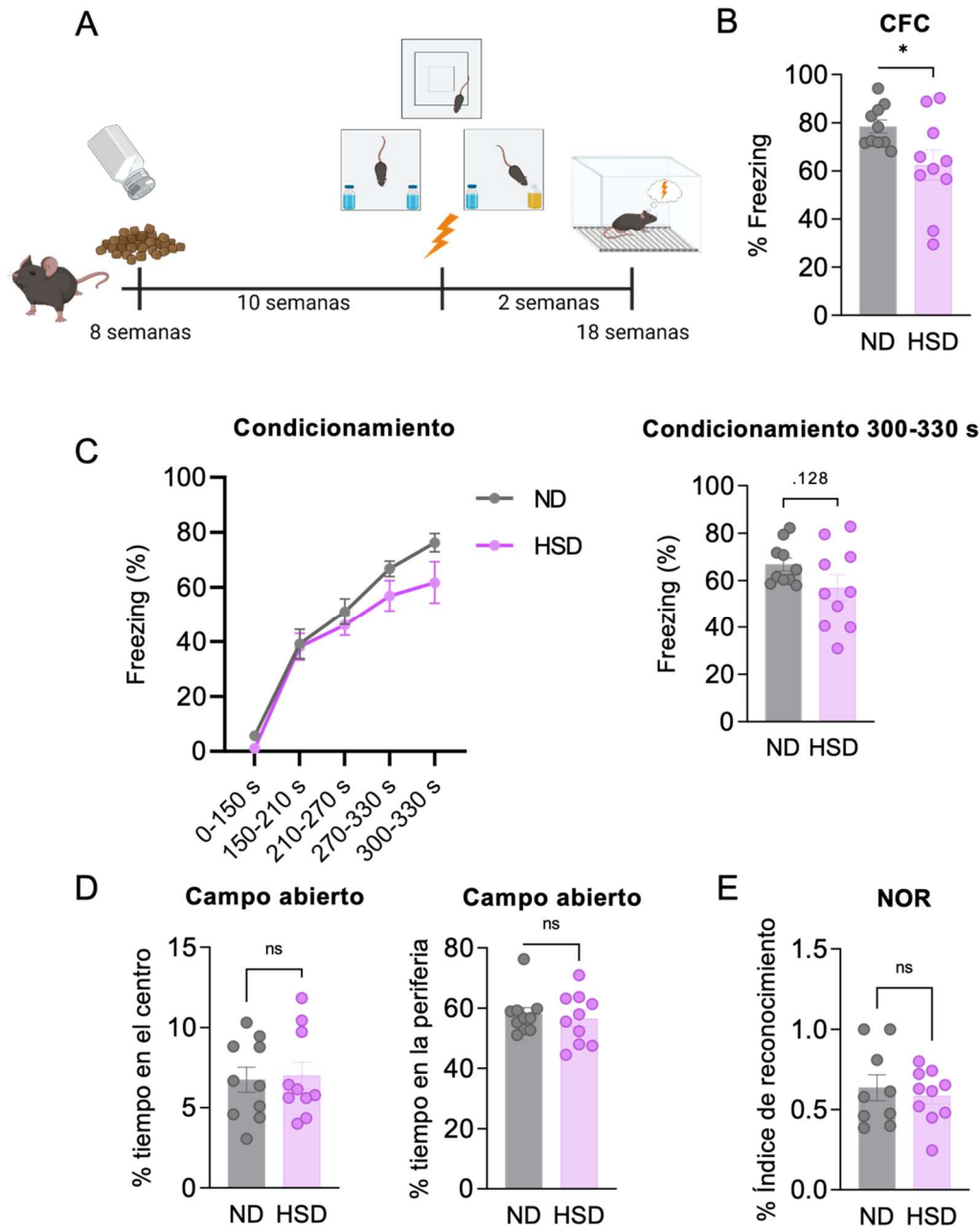


Fig. 31. Evaluación cognitiva del efecto a largo plazo (10-12 semanas) de una dieta alta en sodio. (A) Diseño experimental empleado en este grupo experimental. (B) Evaluación de la respuesta de freezing durante la fase de retrieval del test CFC en un diseño anterógrado. Condicionamiento realizado 10 semanas después del inicio de la dieta y retrieval 2 semanas después.  $n=10$ . (C) Respuesta de freezing durante la fase de condicionamiento, los intervalos se corresponden con los tiempos de los shocks eléctricos. (D) Porcentaje de tiempo empleado por los animales en la periferia y en el centro de la prueba de campo abierto. (E) Cuantificación del índice de reconocimiento del nuevo objeto durante la prueba NOR.  $n=9-10$ . Datos representados como media  $\pm$  SEM; se compararon las medias mediante la  $t$  de Student.  $*p<0.05$ .

### 2.2.2 Efecto de 10-12 semanas de HSD en la memoria episódica y de reconocimiento

Tras la evaluación a corto plazo decidimos comprobar el estado cognitivo de los animales tras períodos más largos de exposición a dieta alta en sal. Para ello evaluamos la memoria episódica de reconocimiento visual por medio del test NOR tras 10 semanas de HSD. Posteriormente hicimos el condicionamiento para el CFC y realizamos el *retrieval* 2 semanas después, realizando así un protocolo anterógrado con el que también evaluar la memoria episódica. Puesto que para realizar la prueba NOR se hace un test de campo abierto como habituación, evaluamos también el tiempo pasado por los ratones en la periferia y el centro durante la fase de habituación.

No encontramos diferencias significativas en los tiempos empleados en ninguna de las dos regiones (Fig. 31 A), lo que indica que las características exploratorias de los animales son similares y no hallamos indicios de ansiedad mediante esta prueba en nuestros ratones sometidos a HSD durante 10 semanas. Cuando evaluamos el índice de reconocimiento del nuevo objeto en la prueba NOR tampoco hallamos diferencias significativas (Fig. 31 B), descartando que nuestro modelo de HSD durante 10 semanas provoque un déficit en la memoria episódica de reconocimiento visual. Finalmente evaluamos la respuesta de *freezing* 2 semanas después de la realización del condicionamiento mediante el CFC. En este caso, nuestros datos muestran una reducción en el *freezing* de los animales sometidos a una dieta alta en sodio durante 12 semanas, indicando un deterioro de la memoria episódica en esta tarea.

### **2.3 Estudio del efecto de la HSD sobre la neurogénesis hipocampal**

Dado que el incremento de sodio en la dieta incide negativamente en la memoria dependiente del hipocampo, decidimos estudiar posibles sustratos celulares involucrados. Por ello, exploramos posibles alteraciones en la neurogénesis hipocampal, al igual que en el modelo BCAS, por medio del marcador de neuroblastos DCX.

Hallamos que, paralelamente al déficit de memoria episódica (hipocampo-dependiente) a las 5 semanas de dieta, los ratones expuestos a altas dosis de sal en la dieta mostraron un descenso en el número de neuroblastos (DCX<sup>+</sup>) en la CG en comparación con sus correspondientes animales control (Fig. 32 A-B). por ello, de forma similar al estudio realizado con el modelo de hipoperfusión crónica, decidimos estudiar la morfología de las nuevas neuronas hipocampales, dada su relación con su capacidad para establecer conexiones e integrarse en los circuitos neuronales.

Cuando medimos la dendrita apical de las células DCX<sup>+</sup>, hallamos una reducción significativa en su longitud tras 5 semanas de dieta alta en sodio (Fig. 32 C-D). Esto podría

incidir de forma relevante en la correcta homeostasis hipocampal y en su capacidad de formar circuitos neuronales con los que consolidar nuevas memorias eficazmente.

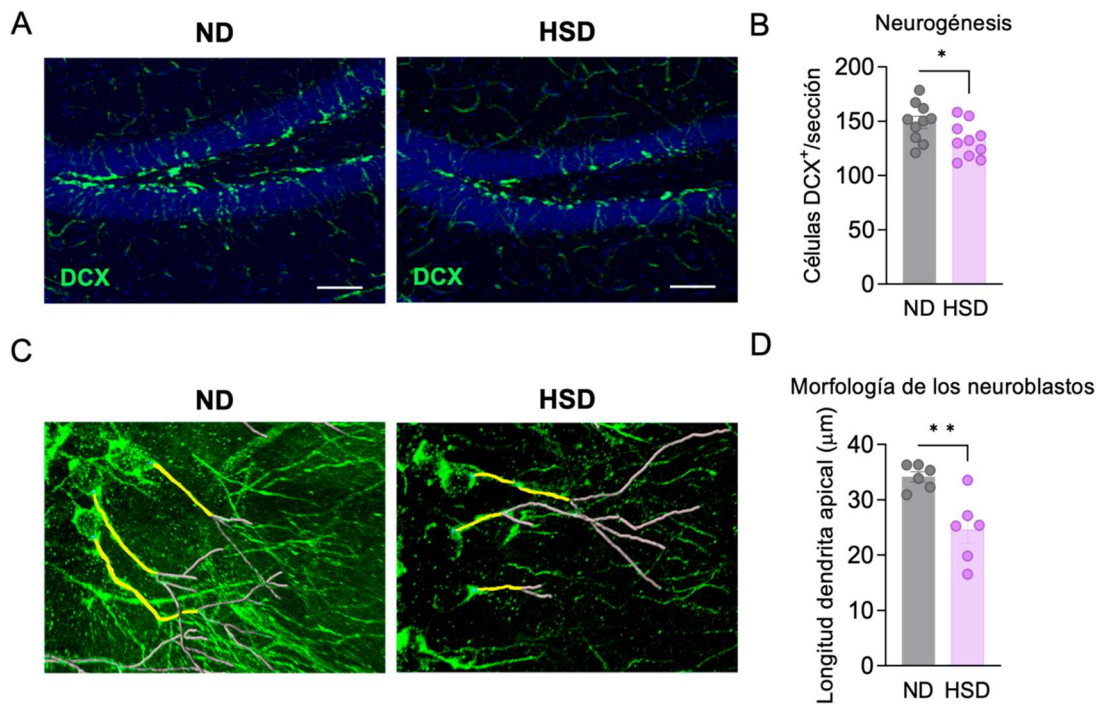


Fig. 32. Estudio de la neurogénesis hipocampal adulta en animales sometidos a una dieta alta en sodio. (A) Microfotografías confocales representativas del marcaje con doblecortina (verde) en el giro dentado, núcleos marcados con DAPI (azul); barra de escala = 75 μm. (B) Cuantificación del número de neuroblastos (DCX<sup>+</sup>) de la capa granular. n=10. Se utilizó la t de Student para comparar las medias. (C) Microfotografías confocales mostrando en detalle el trazado de las dendritas apicales de los neuroblastos; DCX (verde). (D) Evaluación de la longitud de la dendrita apical de los neuroblastos. n=5. Se compararon los rangos mediante la U de Mann-Whitney. Datos representados como media ± SEM. \*p<0.05 \*\*p<0.01.

## 2.4 Evaluación del efecto de la HSD sobre la dinámica del nicho neurogénico hipocampal

Con el fin de determinar qué cambios podrían contribuir a las alteraciones observadas en la neurogénesis tras 5 semanas de dieta, procedimos a analizar diferentes poblaciones del nicho neurogénico hipocampal, incluidas las células progenitoras y los astrocitos.

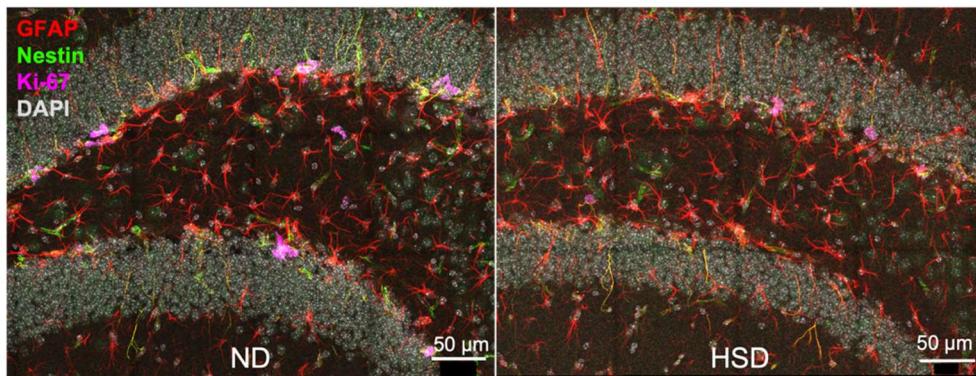
### 2.4.1 Efecto de una HSD sobre los cambios del nicho neurogénico hipocampal anteriores a los cambios observados en los neuroblastos

En primer lugar, por medio de una inmunofluorescencia observamos las poblaciones de células progenitoras neurales quiescentes (QNP, del inglés *Quiescent Neural Progenitor*) y

de células progenitoras neurales amplificadoras (ANP, del inglés *Amplifying Neural Progenitor*) tanto totales como proliferativas (por medio del marcador de ciclo celular Ki-67). Analizamos el número de estas poblaciones en el nicho neurogénico tras tres semanas de HSD, para estudiar su posible implicación en el descenso del número de neuroblastos 2 semanas después, puesto que son las encargadas de generarlos.

En la Fig. 33 A se pueden observar imágenes representativas de ambas condiciones que fueron analizadas contando el número de cada una de las poblaciones. El consumo elevado de sal en la dieta provocó un descenso en el número de células ANP (Nestina<sup>+</sup> GFAP<sup>+</sup>), así como de las ANP proliferativas (Nestina<sup>+</sup> GFAP<sup>+</sup> Ki-67<sup>+</sup>) (Fig. 33 B). Asimismo, resultó disminuida la ratio entre los progenitores amplificadores y los quiescentes, indicando una ralentización en la generación de nuevas neuronas hipocampales. Por el contrario, el número de células QNP no resultó alterado por la dieta, señalando que probablemente el ritmo de entrada en ciclo de estas células no estaba siendo afectado.

A



B

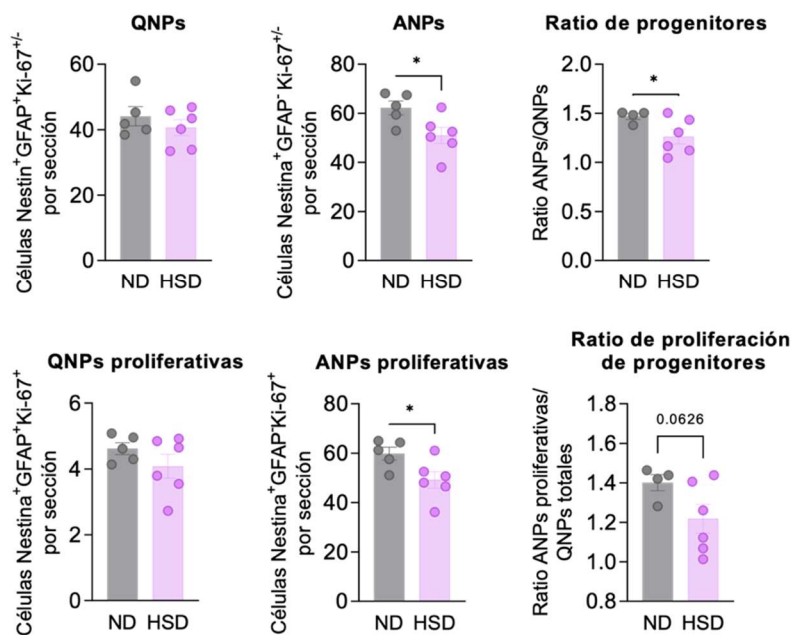


Fig. 33. Poblaciones del nicho neurogénico hipocampal tras tres semanas de dieta alta en sodio. (A) Microfotografías confocales representativas del giro dentado, GFAP (rojo), nestina (verde), Ki-67 (magenta) y DAPI (blanco). (B) Cuantificación de las poblaciones del nicho neurogénico: células QNP como nestina<sup>+</sup>GFAP<sup>+</sup>; células QNP proliferativas como nestina<sup>+</sup>GFAP<sup>+</sup>Ki-67<sup>+</sup>; células ANP como nestina<sup>+</sup>GFAP<sup>-</sup>; células ANP proliferativas como nestina<sup>+</sup>GFAP<sup>-</sup>Ki-67<sup>+</sup>. El ratio de progenitores se obtuvo como el cociente entre el número de células ANP y las células QNP y el ratio de progenitores proliferativos como el cociente entre el número de células ANP proliferativas y las correspondientes QNP proliferativas. Datos representados como media  $\pm$  SEM las medias se compararon mediante prueba estadística *t* de Student. \**p*<0.05.

#### 2.4.2 Efecto de una HSD sobre los cambios del nicho neurogénico hipocampal simultáneos a las alteraciones en la neurogénesis

En segundo lugar, estudiamos el nicho neurogénico hipocampal tras 5 semanas de dieta, con el fin de detectar aquellos cambios que podrían estar sucediendo de forma simultánea a la disminución en el número de neuroblastos observada.

Comenzamos comprobando si pudieran estar ocurriendo cambios en la apoptosis de las células del nicho neurogénico y también del hipocampo en general, para lo que utilizamos la tinción anti-caspasa-3. La cuantificación del número de células caspasa-3<sup>+</sup> no mostró ninguna diferencia en las estructuras cerebrales analizadas (hipocampo total, giro dentado, hilus y capa granular) tras 5 semanas de dieta (Fig. 34) indicando que, probablemente, la apoptosis incrementada no sea uno de los mecanismos subyacentes a la disminución del número de células DCX<sup>+</sup>. De todas formas, no podemos descartar la implicación de otros tipos de muerte celular como factores participantes en los cambios neurogénicos.

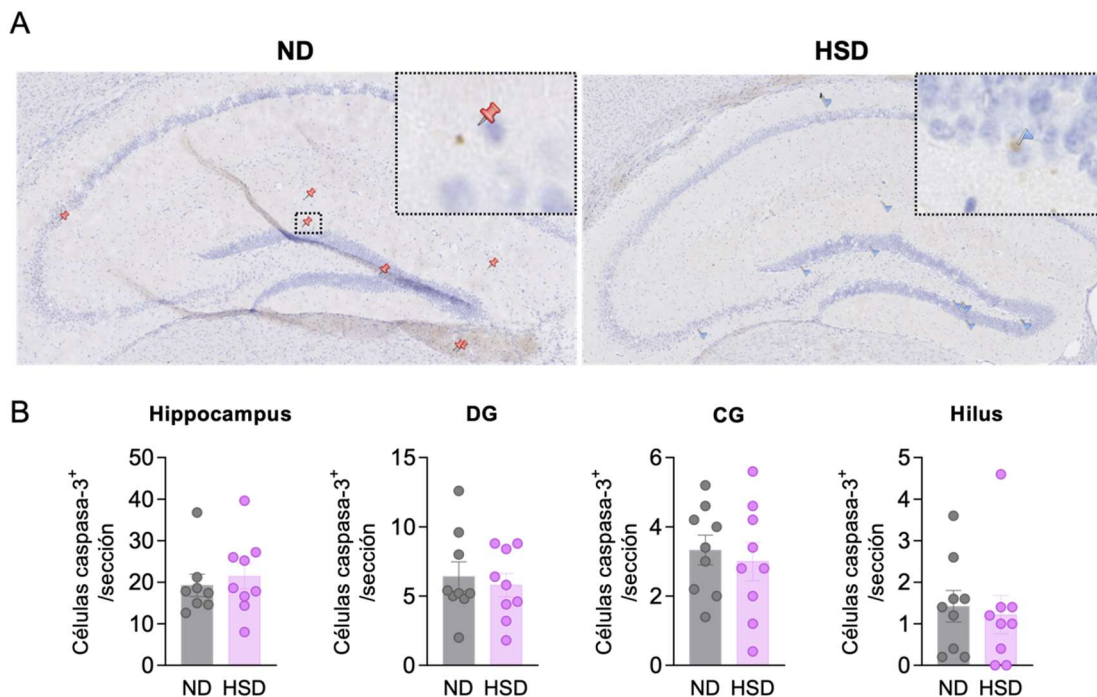


Fig. 34. Evaluación de la muerte celular mediante apoptosis en el hipocampo tras 5 semanas de HSD. (A) Imágenes representativas de la tinción inmunohistológica anti-caspasa-3. Detalle de una célula positiva para el marcaje caspasa-3. (B) Cuantificación del número de células apoptóticas (caspasa-3<sup>+</sup>) en el hipocampo total, en el giro dentado, en la capa granular y en el hilus. Datos representados como media  $\pm$  SEM; las medias se compararon mediante prueba estadística *t* de Student. \**p*<0.05.

A continuación, se evaluó el número de astrocitos presentes en el nicho neurogénico. Los astrocitos son también generados a partir de las células QNP como resultado de su entrada en ciclo para generar células granulares. Una producción alterada de astrocitos puede deberse a un cambio en la dinámica de división de las células progenitoras. Cabe destacar que hallamos un incremento en el número de astrocitos de la zona subgranular (SGZ) (Fig. 35), la primera capa de células de la CG, que es justamente el lugar en el que se inicia la neurogénesis y donde residen las células QNP. Por el contrario, no se vieron diferencias en el número de astrocitos cuando se tuvo en consideración toda la CG (Fig. 35), indicando que ese incremento es específico de la SGZ y sugiriendo su relación con la neurogénesis, así como un origen en las células progenitoras.

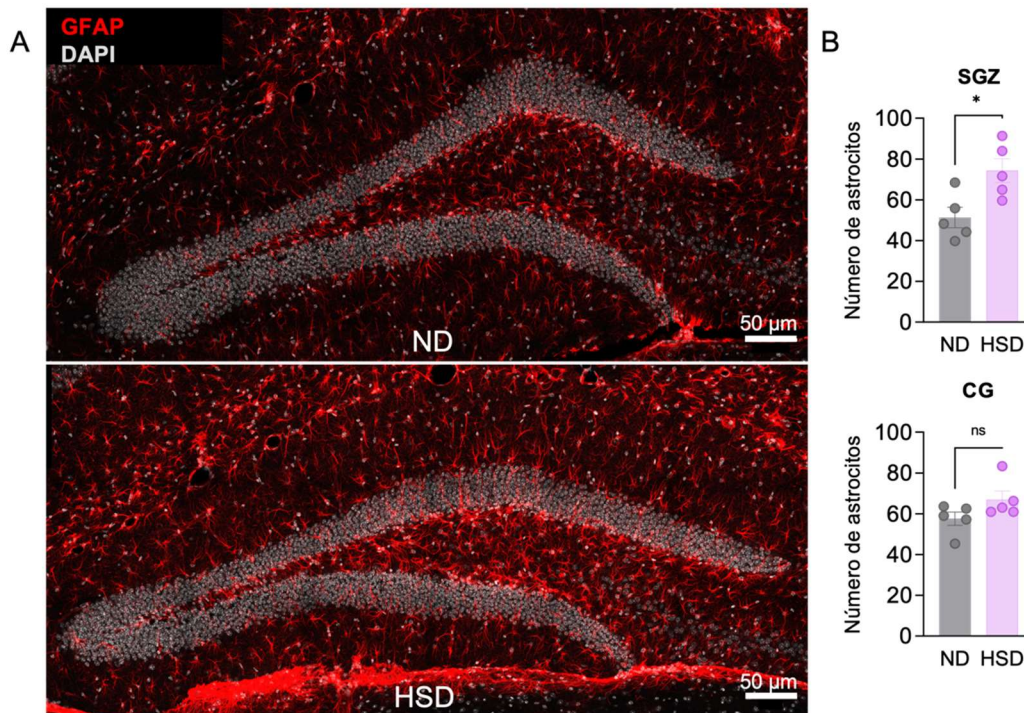


Fig. 35. Estudio de la población de astrocitos en el giro dentado tras 5 semanas de dieta alta en sodio. (A) Microfotografías confocales representativas del giro dentado, GFAP (rojo) y DAPI (blanco). (B) Cuantificación del número de astrocitos en la zona subgranular y la capa granular. *n*=6. Datos representados como media  $\pm$  SEM, las medias se compararon mediante prueba estadística *t* de Student. \**p*<0.05.

#### 4.4.3 Efecto de la HSD sobre los cambios del nicho neurogénico hipocampal a largo plazo

Finalmente, estudiamos los cambios poblacionales del nicho neurogénico hipocampal tras 10 semanas de HSD. El fundamento de este estudio fue conocer si los efectos que tiene el consumo excesivo de sodio sobre las células progenitoras y los astrocitos se mantienen a largo plazo. Se realizó la pertinente inmunofluorescencia y se observó que, en una fase más crónica, se pierde el efecto que tiene la HSD sobre las células ANP, así como los otros cambios observados tras tres semanas de dieta (Fig. 36), ya que no se hallaron diferencias en las poblaciones de QNP, ANP, ni en sus variantes proliferativas tras 10 semanas de HSD. Por el contrario, al analizar el efecto del sodio sobre los astrocitos en la SGZ pudimos observar que se conservaba el incremento en el número de células GFAP<sup>+</sup>nestina<sup>-</sup> (Fig. 36). Al mismo tiempo corroboramos la especificidad de este aumento en la SGZ respecto a la CG, donde de nuevo no se hallaron diferencias significativas (Fig. 36).

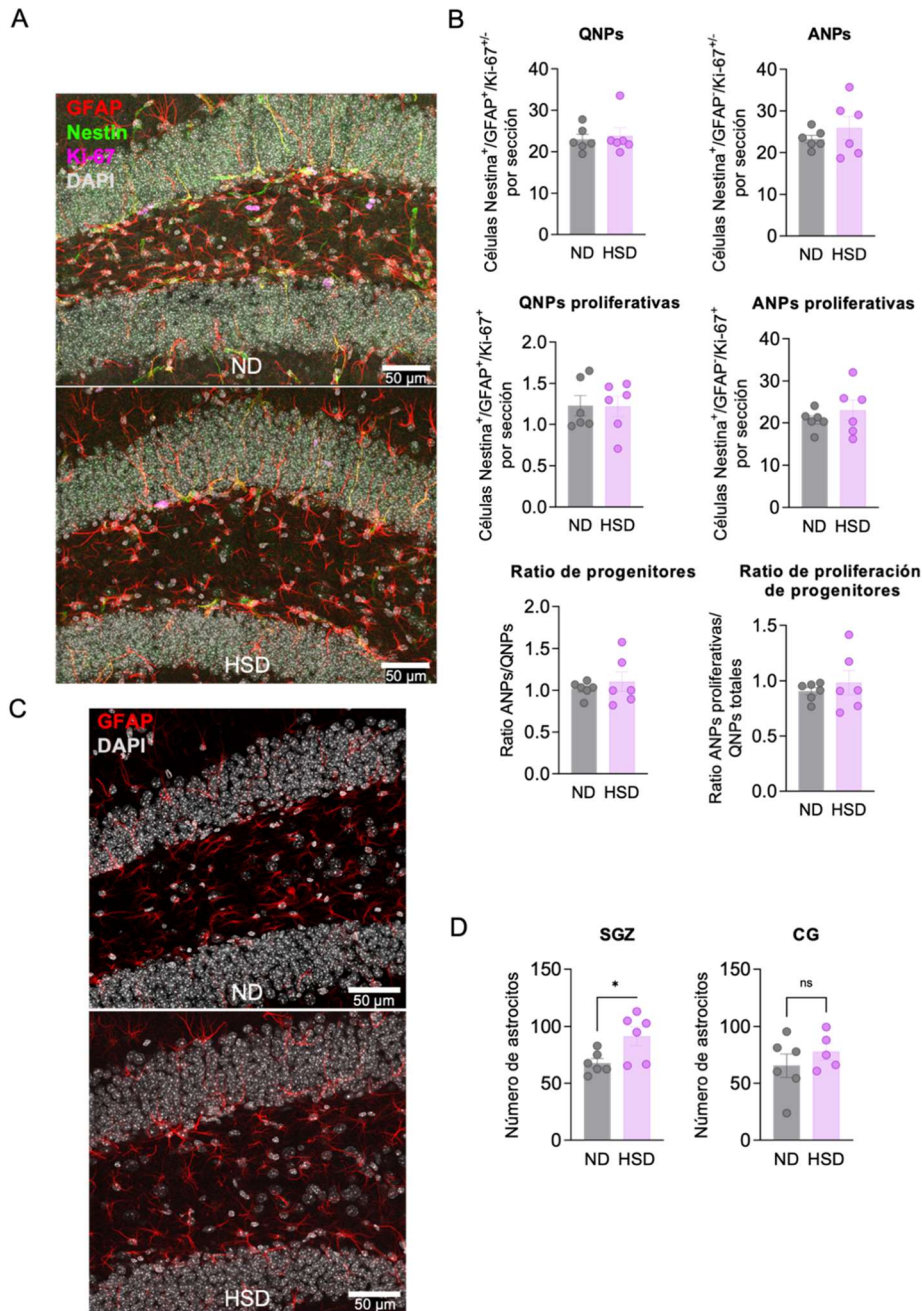


Fig. 36. Poblaciones del nicho neurogénico hipocámpal tras 10 semanas de HSD. (A) Microfotografías confocales representativas del giro dentado, GFAP (rojo), nestina (verde), Ki-67 (magenta) y DAPI (blanco). (B) Cuantificación de las poblaciones del nicho neurogénico: células QNP como  $nestina^{+}GFAP^{+}$ , células QNP proliferativas  $nestina^{+}GFAP^{+}Ki-67^{+}$ , células ANP  $Nestina^{+}GFAP^{+}$ , células ANP proliferativas  $nestina^{+}GFAP^{+}Ki-67^{+}$ , el ratio de progenitores se obtuvo como el cociente entre el número de células ANP entre las células QNP y el ratio de progenitores proliferativos como el cociente entre el número de células ANP proliferativas entre las correspondientes QNP proliferativas.  $n=6$ . (C) Microfotografías confocales representativas del giro dentado, GFAP (rojo) y DAPI (blanco). (D) Cuantificación del número de astrocytos en la zona subgranular y la capa granular.  $n=6$ . Datos representados como media  $\pm$  SEM, las medias se compararon mediante prueba estadística *t* de Student. \* $p<0.05$ .

## Discusión

El esclarecimiento de los mecanismos fisiopatológicos y el descubrimiento de tratamientos efectivos para el VCI son una urgencia diagnóstica y terapéutica de primer orden para la población mundial debido a la alarmante prevalencia y la morbilidad que provoca. La gran diversidad de mecanismos que subyacen al deterioro cognitivo complica la comprensión de la contribución de cada uno de los factores y sus relaciones causa-efecto. Y en conjunto con la escasez de modelos animales apropiados para recapitular el VCI han dificultado avanzar en la investigación de esta patología (Fraga et al., 2023).

En la presente tesis doctoral se ha contribuido a avanzar en el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo del deterioro cognitivo en dos modelos especialmente relevantes por su capacidad para recapitular la clínica humana. El primer modelo, el de BCAS, es un modelo ampliamente estudiado y aceptado por la comunidad científica para estudiar la hipoperfusión inducida por estenosis carotídea como factor desencadenante del VCI. El segundo modelo, además de ser también un modelo de hipoperfusión como ha sido recientemente descrito (Faraco et al., 2018), representa también un modelo de VCI a partir de un hábito dietario extremadamente extendido y cuyas consecuencias apenas han sido estudiadas, además de contribuir al conocimiento sobre la relevancia del eje intestino-cerebro en el rendimiento cognitivo y la homeostasis hipocampal.

Ambos modelos han demostrado además ser particularmente relevantes en cuanto a que ambos conducen a afectación tanto hipocampal como neurogénica, siendo la primera una diana ampliamente reconocida en la clínica y que había sido escasamente estudiada en los modelos animales.

Una de las limitaciones de este estudio es que se ha realizado utilizando solo ratones macho, por lo que a la hora de interpretar las conclusiones ha de tenerse en cuenta que se ha aislado el efecto del sexo sobre los diferentes parámetros analizados y podrían existir diferencias y comportamientos diferentes al considerar también a las hembras.

### **1. Efecto de la hipoperfusión cerebral global crónica inducida por el modelo de BCAS sobre la función cognitiva, la homeostasis hipocampal y la EA**

#### **1.1 Caracterización del modelo de hipoperfusión por BCAS**

En primer lugar, confirmamos que el modelo BCAS utilizado reproducía hallazgos previos de otros autores. En efecto, comprobamos que nuestro modelo produce un descenso del FSC muy acusado en los primeros días tras la cirugía, que se va normalizando con el paso de las semanas hasta aproximadamente un mes post cirugía, cuando se estabiliza y no cambia de forma relevante a los tres meses, coincidiendo con los estudios previos de la bibliografía (Hattori et al., 2016; Shibata et al., 2004).

Puesto que la principal diana de nuestro estudio era el hipocampo hicimos un estudio histopatológico de este. En la tinción de Nissl no encontramos anomalías visualmente reconocibles, ni signos de atrofia de

alguna de sus estructuras. Consistentemente tampoco hallamos diferencias volumétricas, ni uno ni tres meses después de la cirugía.

Finalmente, y dado que este estudio buscaba centrarse en la fase crónica del modelo, más representativa de la patología humana, analizamos diversas citocinas como parámetros de inflamación hipocampal, sin encontrar diferencias en su expresión, tanto de pro- como de anti-inflamatorias. Aunque se ha descrito con anterioridad una respuesta inflamatoria en este modelo a tiempos más cortos (Dong et al., 2011; Duan et al., 2009; Miyahara et al., 2018; Nakaji et al., 2006; Shibata et al., 2004), ahora nuestros datos muestran que esa inflamación, en el hipocampo, podría no ser mantenida en el tiempo o, incluso, ser resultado de la caída brusca de flujo inicial, poco relevante clínicamente, por súbita y acusada. Según datos previos del laboratorio (Violeta Medina, Tesis doctoral, 2019), sí se produce una alteración de la morfología de la microglía; sin embargo, esta se encontró relacionada preferentemente con zonas cerebrales de ruptura de barrera hematoencefálica, más que con un posible estado proinflamatorio (Savage et al., 2019). Por ello, podemos decir que en nuestro modelo no hallamos signos evidentes de inflamación hipocampal tras tres meses de hipoperfusión.

En definitiva, nuestro modelo de BCAS induce una caída de flujo cerebral constante entre uno y tres meses después de la cirugía, no presenta signos de atrofia hipocampal y, con nuestros datos, no hay indicios de inflamación hipocampal tras 3 meses de la cirugía.

## **1.2 La hipoperfusión cerebral crónica inducida por BCAS provoca déficits de memoria espacial de trabajo y de referencia**

Tras tres meses de hipoperfusión, las pruebas de comportamiento mostraron un déficit de memoria hipocampo-dependiente específicamente tanto en la memoria espacial de trabajo como en la de referencia.

Mediante la prueba SAP del laberinto en Y se evalúa la memoria espacial de trabajo, esto es, la capacidad de los ratones para generar, almacenar y recordar la representación interna de su posición respecto al entorno, al tratarse de una prueba egocéntrica. Esto implica que la referencia espacial que tienen los ratones para su orientación es su propia posición. Además, y dado que los ratones exploran en cuestión de decenas de segundos varios de los brazos del laberinto, se trata de una memoria de trabajo, en la que el almacenamiento de la memoria es solo temporal y no se requiere la consolidación del recuerdo. Sin embargo, por la prueba NOL se evalúa la memoria espacial de referencia. En esta prueba la memoria es de tipo allocéntrica, por la cual, basándose en pistas espaciales que le permiten orientarse en su entorno, el ratón debe distinguir el objeto cuya ubicación ha cambiado en el contexto, situándolo como novedoso. En cuanto a la duración de la memoria, al haberse realizado con un intervalo de treinta minutos entre la fase de condicionamiento y de recuperación de la memoria, esta se sitúa entre la memoria de trabajo y la memoria a largo plazo.

Los datos de memoria espacial de trabajo de nuestro estudio están de acuerdo con datos previos en la literatura que muestran que ésta se encuentra afectada a partir de las tres semanas posteriores a la

cirugía y que sigue alterada cuatro, ocho y veinte semanas después (Dong et al., 2011; Maki et al., 2011; Nishio et al., 2010; Shibata et al., 2007). Dado que nuestros datos solo muestran los déficits a partir de los tres meses, en nuestro laboratorio encontramos un desarrollo de la memoria espacial de trabajo más lento, sugiriendo que nuestro modelo pudiera ser más leve.

En lo que se refiere a la memoria de referencia espacial, en estudios previos no aparece dañada a tiempos cortos (1-2 meses), ni evaluada con el laberinto acuático de Morris (MWM) (Coltman et al., 2011) ni mediante el test radial de ocho brazos (Shibata et al., 2007), mientras que su afectación sí ha sido descrita tras seis meses de hipoperfusión mediante el test de Barnes (Nishio et al., 2010). En nuestro modelo, encontramos afectación de la memoria de referencia espacial a un tiempo intermedio, no analizado con anterioridad, y que se sitúa entre los uno-dos meses en los que no se hallaron alteraciones y los seis meses posteriores a la cirugía en los que sí se encontraron.

Ambas pruebas comportamentales sugieren la afectación de dos tipos de memoria muy relacionadas con el hipocampo. Las dos tareas necesitan de la navegación espacial y del uso de la memoria espacial, que son hipocampo-dependiente. Además, en el NOL se requiere de la separación de patrones para distinguir la nueva localización, así como un almacenamiento temporal de la memoria en las estructuras hipocampales.

Estudios previos también han explorado la función de aprendizaje, centrada en la fase de adquisición de la memoria, tanto en las pruebas de memoria espacial con en el MWM (Coltman et al., 2011) o el laberinto radial de ocho brazos (Shibata et al., 2007) como en el test de condicionamiento al miedo contextual (Shibata et al., 2007). Para ello, en el MWM y en el laberinto radial de ocho brazos se evaluaron los días de aprendizaje previos a las pruebas de memoria de referencia espacial, no encontrando diferencias significativas. En el caso del CFC, se realizó en un diseño a corto plazo, en el que se pone mayor énfasis en la generación de la memoria que en su consolidación, evaluando así el aprendizaje más que la propia memoria. Estos datos contrastan con los del SAP, puesto que la memoria requerida durante la fase de aprendizaje, aunque aloctónica en estos casos y no egocéntrica es similar. Esto sugiere que las pruebas con mayor sensibilidad para evaluar el aprendizaje o la memoria espacial de trabajo son las que no refuerzan con recompensas la realización correcta de la tarea.

Conjuntamente, estos datos indican que la hipoperfusión cerebral crónica provoca el deterioro de la memoria espacial de trabajo egocéntrica y de referencia a los tres meses. En nuestro laboratorio no hemos comprobado los déficits dos meses tras la cirugía y, en contraste con la literatura, no hemos hallado el deterioro de la memoria de trabajo egocéntrica espacial tras un mes de hipoperfusión.

### **1.3 La hipoperfusión cerebral crónica altera la neurogénesis hipocampal adulta de manera concomitante al deterioro cognitivo observado**

Dada la alteración observada de las capacidades cognitivas hipocampo-dependientes, decidimos explorar la neurogénesis hipocampal, por tratarse de un proceso considerado clave en la generación de nuevas memorias en el hipocampo. Los neuroblastos (o neuronas inmaduras granulares), con su característica

hiperexcitabilidad, participan activamente en la generación de las representaciones internas, la primera fase de la memoria, así como en la separación de patrones, estableciendo conexiones con la corteza entorrinal (CE) y con las neuronas piramidales de CA3 (Akers et al., 2014; Gonçalves et al., 2016; Kempermann et al., 2015; Sahay et al., 2011; Zhao et al., 2008). Por ello, alteraciones en la neurogénesis han sido relacionadas con fallos en la codificación de la memoria y, por tanto, con la disfunción de la memoria hipocampo-dependiente en diversas condiciones fisiológicas y patológicas (Cuartero et al., 2019; Cuartero et al., 2021; Kim et al., 2022; Márquez-Valadez et al., 2022; Toda et al., 2019).

La neurogénesis hipocampal adulta debe estar finamente regulada para permitir la correcta adquisición de las representaciones internas y a su vez la consolidación de las memorias. Así, niveles altos de generación de nuevas neuronas se relacionan con una incrementada plasticidad neuronal (Epp et al., 2016) pero también con el *forgetting* (Akers et al., 2014) en condiciones fisiológicas, según el cual la sobreproducción de neuroblastos beneficia la adquisición de nuevos recuerdos mientras que perjudica aquellas memorias ya generadas, especialmente si no se han consolidado en otras estructuras cerebrales (Toda et al., 2019). Con el envejecimiento se produce una caída de la neurogénesis y con ella una disminución en la capacidad de generar nuevos recuerdos y un detrimento de la plasticidad neuronal (Villeda et al., 2011).

Por su parte, también se han descrito incrementos y descensos de la actividad neurogénica en el contexto patológico. Así, nuestro grupo ha descrito que en el ictus isquémico se produce una neurogénesis exacerbada, que cursa además con alteraciones de la morfología de los neuroblastos y es la causante del deterioro cognitivo (hipocampo-dependiente) post-ictus (Cuartero et al., 2019). En otras patologías, como en el Alzheimer (Kim et al., 2022; Moreno-Jiménez et al., 2019) o en modelos de epilepsia (Sierra et al., 2015), es la disminución de la formación de nuevas neuronas la que se relaciona con un peor rendimiento cognitivo. En el caso del modelo de epilepsia, la disminución de la neurogénesis se debe a una depleción del nicho neurogénico, perdiéndose los progenitores y causando la incapacidad de generar nuevas neuronas.

En nuestro modelo de hipoperfusión por BCAS hemos observado una reducción del número de neuronas inmaduras (DCX<sup>+</sup>) en el giro dentado tres meses después de la cirugía. Además, no observamos cambios en el número de células DCX<sup>+</sup> tras un mes de hipoperfusión, lo que sugiere que la reducción de los neuroblastos a tres meses no se asocia a una depleción del nicho sino a una reducción en la proliferación o diferenciación de las células progenitoras, a una menor supervivencia de los progenitores intermedios, a una menor división de estos o a una combinación de las anteriores. La reducción en el número de neuroblastos tras tres meses de hipoperfusión es concomitante con el deterioro cognitivo (hipocampo-dependiente) observado, lo que sugiere una relación causa-efecto entre ambos fenómenos. Nuestros hallazgos, en nuestro conocimiento, son los primeros que describen alteraciones de la neurogénesis hipocampal en el modelo de hipoperfusión por BCAS. Higaki y Song hallaron tendencias hacia la reducción del número de células DCX<sup>+</sup> seis semanas después de la cirugía (Higaki et al., 2018; Song et al., 2018); Soares y colaboradores sí observaron una reducción notoria de los neuroblastos tras solo 14 días de hipoperfusión (Soares et al., 2013), pero utilizando el modelo de oclusión bilateral de las arterias

carótidas (BCAO), mucho más severo. El descenso que observaron estos autores en el modelo BCAO fue de aproximadamente un 50% que, contrastado con la reducción del 30% que se observa en el presente estudio, sugiere una respuesta neurogénica dependiente de la intensidad de la hipoperfusión. La reducción que observamos nosotros (30%) es comparable al observado en la clínica con pacientes de EA estadio Braak I (Fraga et al., 2023; Moreno-Jiménez et al., 2019).

Otro hallazgo importante de nuestro estudio es que, con respecto a la arborización dendrítica de las neuronas inmaduras, la morfología de los neuroblastos aparece alterada, lo que se manifiesta particularmente como un acortamiento de la dendrita apical tres meses después de la BCAS. La importancia de una correcta arborización dendrítica para que los neuroblastos puedan contribuir a la memoria es crítica, puesto que la capacidad de generar las representaciones internas depende de la adecuada y correcta sinapsis entre las neuronas de la CE y las dendritas de las células granulares, especialmente las nuevas neuronas (Shapiro et al., 2007). Las alteraciones del árbol dendrítico de los neuroblastos han sido, también, sujeto de estudio en diversos escenarios patológicos como el ictus o la EA (Cuartero et al., 2019; Llorens-Martín et al., 2015). Concretamente, la reducción de la longitud de la dendrita apical de los neuroblastos se ha asociado con un fallo de la conectividad de los circuitos hipocampales y con deterioro cognitivo, afectando a la plasticidad neuronal y a la memoria episódica de reconocimiento y espacial (de la Parra et al., 2018; Márquez-Valadez et al., 2022). Por tanto, nuestros hallazgos están en sintonía con la literatura existente, y sugieren que el deterioro cognitivo provocado por la hipoperfusión está relacionado con un fallo de la conectividad hipocampal dependiente de la generación de nuevas neuronas y de su correcta arborización dendrítica.

A continuación, nos preguntamos por la naturaleza de los mecanismos responsables de las alteraciones cuantitativas de la neurogénesis. Para explorar esto, se diseñaron dos experimentos orientados a evaluar la posible contribución de un cambio en la proliferación en los estadios finales de la diferenciación neurogénica y/o de una elevación de la apoptosis en el giro dentado como consecuencia de la hipoperfusión.

La apoptosis es un proceso que sucede de forma fisiológica durante la fase de maduración postmitótica temprana, esto es, cuando las células terminan su proceso de división y comienzan el de maduración (Kempermann et al., 2003; Kuhn et al., 2005). La función de esta apoptosis es la de regular y adecuar el número de nuevas neuronas a las necesidades hipocampales, de tal manera que solo aquellas que han sido capaces de integrarse en los circuitos del hipocampo sobrevivirán (Kempermann et al., 2015). Por tanto, para explorar la posible implicación de una alteración de la regulación de la apoptosis en la neurogénesis, se realizó una tinción anti-caspasa-3 activada, un marcador de la apoptosis celular. De esta manera encontramos un incremento considerable y significativo de la apoptosis en el giro dentado y en el hipocampo cuantificado globalmente, así como una fuerte tendencia en la capa granular. Estos datos sugieren que la hipoperfusión induce una apoptosis exacerbada, lo que contribuiría a reducir el número de nuevas neuronas. Al no ser este incremento selectivo de la capa granular ni del giro dentado, no podemos descartar que la apoptosis sea un fenómeno generalizado en el hipocampo como consecuencia, por ejemplo, de estrés oxidativo causado por un incremento de las ROS (asociadas a la hipoxia) y/o por

la carencia de nutrientes, originados por la hipoperfusión. Puesto que desconocemos la naturaleza de las células apoptóticas, la apoptosis incrementada podría estar ocurriendo también en células que no participen en la neurogénesis, aunque necesitamos más estudios para determinar la contribución diferencial de éstas al déficit cognitivo.

Puesto que pretendíamos identificar alteraciones proliferativas que pudieran estar implicadas en los cambios en el número de neuroblastos observados tras tres meses de hipoperfusión, la proliferación se evaluó un mes después de la cirugía. Así, hallamos una reducción en el número de neuroblastos proliferativos y en la ratio de neuroblastos proliferativos respecto al total, sin alteraciones globales de la proliferación del giro dentado y corroborando que el número de neuroblastos totales a este tiempo, un mes de hipoperfusión, aún no está alterado comparado con sus controles *sham*. Estos resultados indican que la hipoperfusión desencadena una reducción en la capacidad proliferativa de los neuroblastos, previa a la reducción global de nuevas neuronas observada, pudiendo así constituir uno de los factores que causen esta última.

Nuestros datos apoyan que la hipoperfusión induce, conjuntamente, un descenso en la proliferación de los neuroblastos previa a la reducción del número de nuevas neuronas así como un incremento de la apoptosis celular, que podrían contribuir a explicar el defecto cuantitativo neurogénico y la subsiguiente alteración de la memoria.

## **1.4 Efecto de la hipoperfusión sobre signos histopatológicos de la EA**

Con el fin de explorar los posibles mecanismos moleculares que afectan al sensible nicho neurogénico y a la memoria hipocampo-dependiente, decidimos explorar el efecto de la hipoperfusión cerebral crónica sobre los hitos histopatológicos de la EA, dada la cada vez más sólida evidencia de la contribución vascular al desarrollo de ésta, incluso en la patología no considerada mixta, e indagando también así en el posible rol coadyuvante de la patología cerebrovascular en el desarrollo y/o agravamiento de la EA.

### 1.4.1 La hipoperfusión cerebral provoca una mayor fosforilación de la proteína TAU

Primeramente, exploramos los posibles efectos de la hipoperfusión sobre la fosforilación de TAU en animales *wild-type* (WT), como habíamos hecho en los estudios de la neurogénesis y la memoria espacial, tratando de encontrar un posible mecanismo que pudiera estar afectando a las nuevas neuronas e interfiriendo con el desarrollo de su árbol dendrítico. TAU es una proteína asociada a microtúbulos esencial para la estabilización de los microtúbulos, para el transporte axonal y para la morfología neuronal (Cleveland et al., 1977; Weingarten et al., 1975), por lo que su fosforilación, insolubilización y agregación puede impedir el correcto desarrollo de sus funciones fisiológicas.

Utilizando dos anticuerpos selectivos de dos tipos de fosforilación de TAU diferentes, uno más específico de las fosforilaciones típicas del hipocampo (AT8) y otro más general (44-768G), encontramos por western blot un incremento significativo y selectivo de la fosforilación de TAU en el hipocampo. La especificidad del incremento de P-TAU en el hipocampo nos sugería su asociación con los déficits cognitivos hallados y con las alteraciones de la neurogénesis, particularmente en la alteración del árbol dendrítico. Esta

selectividad regional podría estar relacionada con la mayor sensibilidad del hipocampo a la hipoperfusión (Shih et al., 2013). Otros autores han observado una mayor fosforilación de TAU en diversos modelos con hipoperfusión cerebral crónica (Faraco et al., 2019; Pluta et al., 2018; Qiu et al., 2016; Zhao et al., 2014), y algunos la han asociado con la menor disponibilidad de oxígeno (Raz et al., 2019) o de glucosa (Zhao et al., 2014).

Con el fin de explorar la hipótesis de que el incremento de P-TAU estuviese provocando el fallo en el correcto desarrollo de la dendrita apical de las nuevas neuronas granulares del hipocampo, y se relacionase con el deterioro cognitivo, realizamos inmunofluorescencias con los dos anticuerpos anti-P-TAU de los que disponíamos, sin embargo, la baja calidad de las inmunofluorescencias no nos permitió obtener ningún resultado de estos experimentos. Por este motivo la implicación de la fosforilación de TAU en la morfología de las nuevas neuronas y en los déficits de memoria hipocampal es aún una relación por confirmar y que abordaremos en futuros estudios.

Con la evidencia de que disponemos, podemos afirmar que la hipoperfusión cerebral crónica inducida por BCAS provoca un incremento de la fosforilación de TAU (residuos Ser199, Ser202 y Thr205) que es selectiva del hipocampo y que es concomitante a las alteraciones de la neurogénesis y al deterioro cognitivo de la memoria espacial.

#### 1.4.2 La hipoperfusión cerebral crónica constituye un factor coadyuvante en el desarrollo de la EA

En paralelo, exploramos también la posible contribución de la hipoperfusión cerebral crónica al desarrollo de la EA. La principal limitación del ratón como modelo de EA es la incapacidad para generar placas de A $\beta$  de forma espontánea; incluso cuando se somete a los ratones a procedimientos que incrementan el péptido A $\beta$  insoluble, éste no llega a agregar (Khan et al., 2015; Masuda et al., 2016). Por este motivo, para poder explorar el efecto y contribución de la hipoperfusión al desarrollo de las placas de A $\beta$  y a la fosforilación e insolubilidad de TAU, recurrimos a un modelo murino de EA, si bien intentamos que fuera uno lo menos agresivo posible de modo que recapitulase mejor la patología humana. El modelo elegido fue el APP<sup>NL-F</sup>, que se caracteriza por un desarrollo paulatino y progresivo de la amiloidosis, comenzando a desarrollarse las placas en torno a los seis meses de edad y siendo más relevantes a los doce meses; no genera la aparición de ovillos neurofibrilares y el deterioro cognitivo asociado es de desarrollo tardío, a partir de los 15-18 meses de edad, y ello sin aumentar la cantidad de proteína APP expresada (Saito et al., 2014). Con estas características presentes, planificamos los experimentos hipotetizando que la hipoperfusión inducida de modo tardío, a los doce meses de edad (durante la edad media de los ratones, aproximadamente entre 40 y 50 años humanos), pudiese tener un efecto agravando los signos histopatológicos de la EA y adelantando el desarrollo del deterioro cognitivo, lo que nos proporcionaría una valiosa evidencia sobre la contribución de la hipoperfusión al desarrollo de la EA.

Lo primero que exploramos fue la fosforilación de TAU en la corteza, tal y como habíamos hecho en animales WT. Observamos que, en este caso, la hipoperfusión cerebral crónica sí fue capaz de inducir un incremento en la fosforilación de TAU (ratio P-TAU/TAU) en la corteza de animales APP<sup>NL-F</sup>. Dado que

la hiperfosforilación de TAU es solo el primer paso en la cascada de eventos que llevan al fallo de su función fisiológica y de la formación de ovillos neurofibrilares, decidimos explorar la solubilidad de TAU, más directamente relacionada con su pérdida de función (Bussian et al., 2018; Koike et al., 2011), mediante su fraccionamiento tanto en la corteza como en el hipocampo. La realización de esta técnica de fraccionamiento supuso una limitación para evaluar la fosforilación de TAU en el hipocampo de animales APP<sup>NL-F</sup>, ya que al ser todo el hipocampo necesario para el fraccionamiento no se pudo dividir la muestra. En este caso, hallamos una mayor proporción de TAU insoluble en el hipocampo, pero no en la corteza. Por tanto, la hipoperfusión cerebral crónica actúa como un potenciador de la fosforilación de TAU en la corteza y de la insolubilidad de TAU en el hipocampo de animales APP<sup>NL-F</sup>. Probablemente, también provoque un incremento en la fosforilación de TAU en el hipocampo. Si bien se ha determinado la solubilidad de TAU al ser un factor crítico para su función, necesitamos más estudios para evaluar la correlación entre fosforilación de tau y solubilidad en corteza e hipocampo, tanto en WT como en APP<sup>NL-F</sup>.

A continuación, exploramos el efecto de la hipoperfusión sobre la deposición de placas de  $\beta$ -amiloide. Para ello utilizamos un marcaje con el anticuerpo de A $\beta$  y una tinción posterior con el pigmento fluorescente, tioflavina S (ThioS), que presenta una unión preferencial a proteínas mal plegadas y agregadas, particularmente quedando atrapada dentro de láminas B apiladas (MacKeigan et al., 2023). La combinación de ambos marcadores nos permite distinguir: placas densas o compactas (A $\beta^+$ , ThioS<sup>+</sup>), que se relacionan con zonas en las que la microglía ha contribuido a limpiar y a compactar el péptido A $\beta$  insoluble (Lemke & Huang, 2022), placas difusas (A $\beta^+$ , ThioS<sup>-</sup>), que no han intentado ser compactadas, y placas totales (A $\beta^+$ , ThioS<sup>+/-</sup>). Los resultados sugieren que la BCAS aumenta la compactación de las placas, como sugiere el incremento en el área ThioS<sup>+</sup> y muestran una tendencia a aumentar el número de placas ThioS<sup>+</sup> y el tamaño de las placas ThioS<sup>+</sup>, siendo las dos últimas partícipes de la primera. Necesitamos aumentar el tamaño muestral para confirmar que la hipoperfusión incrementa el número y el tamaño de dichas placas, lo que daría cuenta de la mayor superficie positiva ThioS<sup>+</sup>. Con respecto a las placas difusas, la hipoperfusión incrementa el tamaño de las placas A $\beta^+$ . En cuanto a las placas totales, no se observaron diferencias. Por todo ello, podemos concluir que la hipoperfusión cerebral crónica inducida por BCAS en el modelo de EA APP<sup>NL-F</sup> provoca un incremento del tamaño de las placas A $\beta^+$  y su mayor compactación, incrementando el área reactiva de las placas compactas. Estos datos sugieren la posibilidad de que la hipoperfusión genere una mayor acumulación de A $\beta^+$ , provocando una mayor activación glial con el fin de detoxificar el exceso de péptido A $\beta^+$ .

Finalmente, estudiamos si la hipoperfusión mantenida durante tres meses era capaz de acelerar el deterioro cognitivo asociado al modelo APP<sup>NL-F</sup>. No encontramos diferencias en el rendimiento cognitivo con ninguna de las pruebas empleadas (SAP, laberinto en Y, NOL) entre los animales sometidos a BCAS y sus correspondientes *sham*. Hay que indicar que los animales control (APP<sup>NL-F</sup> sin hipoperfusión) no discriminaron la ubicación del brazo cerrado (y novedoso) en el laberinto en Y, ni la nueva localización del objeto en el NOL, por lo que no es posible obtener conclusiones acerca de la memoria episódica espacial de referencia. Hipotetizamos que los animales, debido a la edad y la patología asociada al

modelo APP<sup>NL-F</sup>, no fueron capaces de formar las memorias espaciales correctas respecto a las pistas espaciales empleadas y por tanto no pudieron discriminar las nuevas localizaciones. Tan solo podemos exponer conclusiones respecto a la memoria espacial de trabajo medida con el SAP. Así, la hipoperfusión cerebral crónica no provoca, en el modelo de EA APP<sup>NL-F</sup> el deterioro acelerado de la memoria espacial de trabajo en las condiciones experimentales utilizadas de tres meses de hipoperfusión por BCAS. Proponemos que la exploración de la memoria de referencia espacial deberá llevarse a cabo adaptando las pruebas cognitivas a la edad de los ratones.

Globalmente, los resultados obtenidos sugieren que la hipoperfusión cerebral crónica mediada por el modelo BCAS es un factor determinante en la fosforilación e insolubilidad de la proteína TAU en el hipocampo y en el desarrollo y detoxificación de las placas de  $\beta$ -amiloide, pudiendo jugar un papel relevante en el desarrollo y/o la evolución de la EA.

## **1.5 Resumen de los efectos de la hipoperfusión producida por BCAS**

Conjuntamente, nuestros resultados indican que la hipoperfusión cerebral crónica, inducida por BCAS, provoca un deterioro de la memoria episódica espacial de trabajo y de referencia (hipocampo-dependientes), una alteración concomitante de la neurogénesis hipocampal adulta (cuantitativa y cualitativa), así como alteraciones en la dinámica del nicho neurogénico manifestadas en una mayor apoptosis hipocampal y una reducción de la proliferación de los neuroblastos. Además, la hipoperfusión crónica es capaz, de provocar *per se* una fosforilación incrementada de TAU y de agravar los efectos de la EA sobre sus principales marcadores histopatológicos, por lo que concluimos la hipoperfusión es un factor relevante en la patogenia de la EA.

## **2. Efecto de la dieta alta en sodio sobre la función cognitiva y la homeostasis hipocampal**

### **2.1 Caracterización del modelo murino de dieta alta en sal**

Es conocida la resistencia natural de los ratones a la hipertensión arterial, de modo que los modelos de hipertensión requieren de la combinación de varios factores (Kawada et al., 2002; Marques et al., 2017). Recientemente, Faraco y colaboradores propusieron un modelo de dieta alta en sal (8% en el alimento y 0,9% NaCl en el agua de bebida) en el que se inducía un deterioro cognitivo, dependiente del eje intestino-cerebro y mediado por una respuesta Th17, sin producir hipertensión (Faraco et al., 2018).

Dada su relevancia traslacional, decidimos emplearlo en nuestro estudio, pero adaptándolo para inducir un modelo menos agresivo (4% NaCl en el alimento) que el usado por estos investigadores. Así, nuestra dieta alta en sal contiene diez veces más sal (y sodio) que la dieta normal, y se acerca a lo observado según la OMS en la población humana (consumo recomendado de 5 g diarios, respecto del consumo real que oscila entre 10 y 12 g).

Antes de explorar los efectos cerebrales de la HSD, caracterizamos este modelo en nuestro laboratorio. Para ello, empezamos determinando los niveles de presión arterial media. Encontramos un ligero incremento de la presión arterial, que fue significativo tras 5 semanas de dieta. A pesar de ello, en el contexto de los parámetros fisiológicos del ratón este incremento no es sinónimo de hipertensión, puesto que en los modelos murinos valores de presión arterial entre 90 y 115 mmHg se consideran normales (Janssen & Smits, 2002).

A continuación, comprobamos si la reducción de la perfusión cerebral demostrada por Faraco en el modelo más agresivo de HSD se mantenían en nuestro modelo, más leve. Esta evaluación la realizamos tras cinco y diez semanas de HSD. Así, a las cinco semanas observamos un incremento estadísticamente significativo de la perfusión cerebral en el tálamo, mientras que el resto de las estructuras se mantenían con pocas variaciones; en cambio, tras diez semanas observamos tendencias importantes hacia la disminución del FSC en el hipocampo y el cerebro total (hipocampo:  $d$  de Cohen  $d = 0,71$ ; total:  $d$  de Cohen  $= 0,83$ ), a la par que la reducción significativa del flujo en el tálamo. Nuestros datos a diez semanas apuntan en la misma dirección que los de la literatura (Faraco et al., 2018), probablemente de modo menos robusto por la menor agresividad del modelo, sugiriendo que la hipoperfusión causada por el modelo es dependiente de los niveles de exposición al sodio en la dieta. Asimismo, se necesitan algunas semanas para que se establezca la reducción de FSC y, por ello, no observamos cambios tras cinco semanas de HSD salvo en el tálamo, que parece ser una estructura especialmente dependiente de los cambios de regulación por NO. El incremento de la presión arterial en el tálamo a las cinco semanas puede estar relacionado con mecanismos compensatorios que traten de aumentar el flujo al verse comprometida la producción de NO por la IL17, si bien se necesitan más estudios para corroborar este punto.

A continuación analizamos los parámetros hematológicos y bioquímicos del plasma de los ratones. No se observaron cambios significativos en el conteo de células sanguíneas tras cinco semanas de HSD. Las alteraciones bioquímicas consistentes en el tiempo fueron incrementos del colesterol total, la fosfatasa alcalina y el calcio plasmáticos. Se desconoce si el incremento de sodio en la dieta puede influir de algún modo en la regulación del metabolismo del colesterol, y de este modo incrementar sus niveles totales plasmáticos; sin embargo, si consideramos que este incremento se produce en combinación con el aumento de fosfatasa alcalina (que es principalmente producida en el hígado), que también participa en el metabolismo lipídico (Bessueille et al., 2023), nuestros hallazgos podrían estar indicando que la HSD induce una sobrecarga hepática que conlleva un desequilibrio en la homeostasis lipídica. A su vez, el incremento de fosfatasa alcalina, por su relación con la regulación ósea (Fauran-Clavel & Oustrin, 1986), podría interferir en el metabolismo del calcio, incrementando su concentración plasmática.

Finalmente, para completar la caracterización del modelo, exploramos la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) tras diez semanas de HSD, dado el rol fundamental que juega ésta en la compartimentalización del SNC. Datos previos de nuestro laboratorio mostraron una alteración de la BHE después de cinco semanas de HSD (Violeta Medina, Tesis Doctoral, 2019). Consistentemente con ese hallazgo, también en este punto temporal de 10 semanas, más crónico, la permeabilidad de la barrera

hematoencefálica se encuentra también incrementada. El daño de la BHE es uno de primeros signos encontrados en los modelos animales de patología cerebrovascular, y su afectación se relaciona con la pérdida neuronal, la degradación de la sustancia blanca y un incremento de la susceptibilidad del encéfalo (Strickland, 2018; Toth et al., 2017).

Por tanto, el modelo de HSD utilizado provoca un incremento de la presión arterial que sigue dentro de los parámetros fisiológicos normales, un descenso del FSC a partir de las diez semanas de HSD, cambios bioquímicos posiblemente relacionados con alteraciones hepáticas y disfunción de la BHE.

## **2.2 La dieta alta en sal induce deterioro cognitivo de la memoria episódica contextual**

En la presente Tesis Doctoral hemos explorado el efecto de la exposición a HSD sobre la función cognitiva de los animales, utilizando diferentes protocolos de exposición (5-10 semanas) y de evaluación (retrógrado vs anterógrado). Los protocolos anterógrados dependen de las tres fases de la memoria (adquisición o codificación, consolidación y recuperación o recuerdo) mientras que los diseños retrógrados no evalúan la adquisición y se centran más en la recuperación que en la consolidación.

En primer lugar, al explorar la memoria episódica contextual tras la exposición a la HSD durante 5 semanas, se observó una alteración que se manifestó en reducciones del *freezing* de los animales cuando el diseño del test se hacía de modo retrógrado sobre las cinco semanas de dieta. Sin embargo, no hubo diferencias cuando se hizo en un diseño anterógrado en el que el condicionamiento se realiza tras tres semanas de dieta y el *retrieval* al final de la exposición, dos semanas después. Para interpretar estos resultados, se debe tomar en consideración qué evalúa cada tipo de diseño experimental y que los tiempos de dieta a los que están sometidos, aunque siendo globalmente iguales, son diferentes cuando nos fijamos en el tiempo entre el condicionamiento y el *retrieval*. Así, aunque el CFC anterógrado no indica que haya una alteración de la memoria episódica tras cinco semanas de HSD cuando la memoria se genera tras tres semanas de HSD y se evalúa dos semanas después, no podemos descartar que la recuperación de la memoria pueda verse comprometida a tiempos más largos (por una posible peor consolidación). Concretamente, nos permite inferir que **no** hay déficits en la fase de **adquisición** de las representaciones internas, pero **no podemos descartarlos** en la fase de consolidación, que podría ser más frágil pero no tener sensibilidad para detectarlo a tiempos cortos, o en la fase de recuperación, que podría ser igualmente sensible al tiempo transcurrido hasta que tiene lugar.

Por su parte, el CFC retrógrado, por su naturaleza, no evalúa la fase de adquisición, y no se centra en la de consolidación, sino en la de recuperación. El defecto de memoria episódica con este diseño nos indica, pues, que se produce una deficiencia de la recuperación de las memorias episódicas tras cinco semanas de HSD. Este efecto, puesto en el contexto de los resultados del diseño anterógrado, que no muestra alteraciones en la adquisición de la memoria, parece indicar que el consumo de una dieta alta en sal perjudica las memorias ya establecidas, pudiendo debilitarlas o imposibilitar su recuerdo. Además, cinco semanas de dieta tampoco provocan déficits de la memoria episódica espacial egocéntrica de trabajo, como indica que los ratones HSD obtengan porcentajes de alternancias espontáneas similares a los de

los controles ND, lo cual refuerza la conclusión de que cinco semanas de HSD no provoca déficits en la fase de adquisición de memorias.

También exploramos el efecto de la exposición a dieta alta en sodio durante períodos más largos, de 10 semanas, más parecidos a los descritos en la literatura (Faraco et al., 2018). En primer lugar, observamos que diez semanas de exposición a HSD no provocan alteraciones del estado ansioso de los animales ni déficits en la memoria episódica de reconocimiento visual (NOR). Al utilizar el diseño del CFC anterógrado, con el fin de explorar alteraciones de la memoria episódica contextual tras diez semanas de HSD, realizando la fase de *retrieval* dos semanas después, hallamos un menor *freezing*, indicativo de un déficit de la memoria evaluada. Este diseño es sensible a las tres fases de la memoria (adquisición, consolidación y recuerdo), por lo que una, dos, las tres o una combinación de ellas está afectada debido al consumo de HSD durante diez semanas. Este resultado tras 12 semanas, en el contexto del CFC anterógrado, realizado tras cinco semanas de HSD, nos podría sugerir un defecto en la adquisición o consolidación de la memoria más que de la fase de recuerdo. Esto también se apoya en la tendencia hacia la reducción del *freezing* encontrada en los animales sometidos a HSD durante la fase de condicionamiento, y sugiere que la asociación entre el contexto y la situación adversa pueda verse afectada. Sin embargo, esto necesita ser comprobado con pruebas que evalúen de manera más aislada la fase de aprendizaje de la de recuerdo.

En la literatura se describen déficits en la memoria episódica de reconocimiento (NOR), en la plasticidad neuronal asociada a la memoria episódica espacial de referencia (laberinto de Barnes) y en tareas hipocampo-dependiente como la del test del nido tras doce semanas de dieta HSD (8% NaCl en el alimento y 0,9% NaCl en el agua de bebida (Faraco et al., 2018). Nosotros no hemos hallado el mismo defecto de memoria descrito con el NOR, lo que probablemente se deba al carácter más suave de nuestro modelo en comparación con el de Faraco y colaboradores. Podemos resaltar, en cambio, que tanto ellos como nosotros hemos observado, en una fase más crónica de HSD, defectos de la memoria episódica dependiente de hipocampo, puesto que tanto el CFC como el laberinto de Barnes son pruebas que dependen de esta estructura. Por lo tanto, la dieta alta en sodio provoca déficits de la memoria dependiente de hipocampo, que son dependientes de la concentración de la exposición al sodio y de la duración de la ingesta, de tal manera que la memoria episódica contextual se encuentra afectada con diferente intensidad según la extensión temporal de la exposición, mientras que la memoria episódica de reconocimiento se afecta según los niveles de sodio a los que se expone a los ratones.

### **2.3 La dieta alta en sal compromete la neurogénesis hipocampal cualitativa y cuantitativamente**

De forma similar a lo ocurrido con el modelo de hipoperfusión por BCAS, la alteración de la memoria hipocampo-dependiente en el modelo de HSD nos hizo hipotetizar que la alteración de la neurogénesis hipocampal adulta pudiera estar implicada, afectando a la memoria dependiente del hipocampo. Como ya se ha mencionado, la neurogénesis y las nuevas neuronas granulares tienen un rol muy relevante en la adquisición de las nuevas memorias episódicas espaciales y contextuales, donde el hipocampo juega un

papel principal. Cuando estudiamos la generación de nuevas neuronas mediante el marcador de neuronas granulares inmaduras (o neuroblastos) DCX, hallamos una reducción del número de neuroblastos generados tras cinco semanas de HSD en comparación con los animales alimentados con una ND. Además, al estudiar la arborización dendrítica de las células DCX<sup>+</sup>, observamos una reducción de la longitud de la dendrita apical de los neuroblastos. Como se ha explicado con anterioridad en el punto 1.3, ambos fenómenos, conjuntamente, pueden comprometer la capacidad del hipocampo para formar y almacenar correctamente las representaciones internas que constituyen las bases de la memoria.

La reducción en el número de nuevas neuronas y la alteración de su morfología después de cinco semanas de hipoperfusión podría generar una remodelación de los circuitos sinápticos hipocampales existentes, que tendrían que adaptarse a unas condiciones de neurogénesis comprometidas para la edad de los animales (la neurogénesis disminuye cuantitativamente con la edad de forma fisiológica). Fruto de esa remodelación se podrían debilitar las memorias episódicas adquiridas, como apuntan los resultados del CFC retrógrado en este punto temporal. Sin embargo, hipotetizamos que estos cambios en la neurogénesis no serían suficientes para incapacitar la adquisición de nuevas memorias, de acuerdo con el CFC anterógrado. Si comparamos la reducción en el número de nuevas neuronas granulares con la del modelo de hipoperfusión, el modelo de HSD provoca un descenso del 11%, mientras que el modelo de hipoperfusión, de aproximadamente un 30%. Esta diferencia podría contribuir a explicar por qué la fase de adquisición no está afectada tras tres semanas de HSD, no habiéndose alcanzado el umbral necesario para ello, pero sí para inducir una remodelación de los circuitos que afecte a las memorias existentes debido a la mayor afectación de la morfología.

A falta de comprobar el número de nuevas neuronas tras diez semanas de hipoperfusión, hipotetizamos que el descenso podría intensificarse al cronificarse el estímulo (como ocurre en el modelo de hipoperfusión) y relacionarse con el deterioro de la memoria episódica contextual a ese tiempo, o que la afectación del árbol dendrítico que ya se observa tras cinco semanas de dieta, al conservarse en el tiempo, cause los déficits cognitivos observados en el posterior punto temporal.

Por tanto, el consumo elevado de sodio en la dieta provoca un fallo de la neurogénesis, causando un déficit de nuevas neuronas y una alteración del árbol dendrítico de los neuroblastos que es concomitante al déficit de la recuperación de la memoria episódica observada tras cinco semanas de dieta. Esta alteración podría agravarse, de forma similar a lo ocurrido en el modelo BCAS, y explicar la intensificación del deterioro cognitivo que tiene lugar tras diez semanas de hipoperfusión.

En un segundo artículo, Faraco y colaboradores señalan la fosforilación de TAU y su insolubilización como el factor clave y necesario para que se produzca el deterioro cognitivo (Faraco et al., 2019) mediado por la dieta alta en sodio. Esta alteración de la fosforilación y solubilidad de TAU ocurre en el hipocampo, sin estar restringida a esta estructura. Como se mencionó en el capítulo 1.4 de la discusión, hipotetizamos que la arborización dendrítica de las neuronas granulares se esté viendo afectada por la fosforilación e insolubilización de TAU, mediando de este modo el deterioro cognitivo observado. Más estudios serán necesarios para comprobar el estado de TAU en el modelo HSD, más leve, utilizado en esta tesis, así

como la puesta a punto de técnicas para la observación de P-TAU en las dendritas de las neuronas de la CG y la verificación de la relación entre las alteraciones de TAU y la morfología neuronal por medio de inhibidores de las MAPK o modelos genéticos (Faraco et al., 2019).

## **2.4 Efecto de la dieta alta en sal sobre la dinámica del nicho neurogénico hipocampal**

Con el fin de explorar el origen de los cambios en la generación de nuevas neuronas hipocampales, estudiamos las diferentes poblaciones celulares del nicho neurogénico, así como su estado proliferativo, tras diferentes períodos de dieta alta en sodio, con el fin de explorar la dinámica del nicho a distintas fases: previamente a los cambios en neurogénesis, de manera concomitante y posteriormente a estos.

### 2.4.1 La dieta alta en sal disminuye la proliferación de las células ANP previamente a la reducción del número de neuroblastos

En primer lugar, analizamos las poblaciones de células progenitoras en el nicho neurogénico de animales sometidos a tres semanas de HSD y sus controles de ND. Observamos que la dieta HSD reduce la cantidad de ANP generadas por el nicho, así como su subpoblación proliferativa y la ratio ANP/QNP. Las células QNP, las células madre del nicho neurogénico hipocampal, son las encargadas de salvaguardar la capacidad neurogénica del nicho y de generar nuevas células (tanto neuronas como astrocitos). El fino control del estado de quiescencia y activación de las QNP es esencial para se mantenga el potencial proliferativo del nicho y que se generen nuevas neuronas que se integren en los circuitos hipocampales posibilitando la correcta formación de nuevos recuerdos (Cuartero et al., 2021; Kempermann et al., 2015; Kim et al., 2022; Márquez-Valadez et al., 2022). Las ANP, por su parte, son células intermediarias entre la población de células madre y las que serán nuevas neuronas hipocampales. Las ANPs tienen una dinámica particular, en la que su principal cometido es dividirse generando múltiples células a partir de una sola ANP generada mediante la división asimétrica de una QNP. De este modo, aumentan las posibilidades de que alguna de las células hijas llegue a integrarse en la capa granular, sobreviva a la fase de selección apoptótica y establezca sinapsis colaborando en la memoria.

Los cambios observados señalan que la HSD provoca una reducción en la generación de las células ANPs, posiblemente como consecuencia de una menor activación de las células QNP, de una reducción en el número de ANPs que cada QNP puede generar, o por una menor amplificación durante los ciclos de división de las ANPs. La primera posibilidad es la menos probable, dado que no hemos observado una alteración en la ratio proliferativa de las QNP que sería la señal de identidad de este mecanismo, aunque existe una cierta tendencia, por lo que no puede ser descartado completamente. Por otro lado, puesto que la proporción de ANPs Ki-67<sup>+</sup> se ve reducida y este es un marcador de proliferación, podemos proponer a la menor tasa de división de las ANPs como uno de los mecanismos subyacentes implicados, sin descartar la posible contribución de otros. Futuros estudios de “pulso y caza” siguiendo células individuales y su progenie serán útiles para diferenciar adecuadamente estos mecanismos.

De cualquier modo, podemos concluir que la dieta alta en sodio provoca, tras tres semanas, una reducción del número de células progenitoras intermedias, ANPs, y de su subpoblación proliferativo.

#### 2.4.2 La dieta alta en sal provoca un incremento del número de astrocitos en la zona subgranular concomitante a la reducción del número de neuroblastos

Exploramos también si cambios en la apoptosis, de especial relevancia durante la fase temprana de maduración postmitótica, podrían contribuir a los cambios observados en la neurogénesis (Kuhn et al., 2005). Para ello, cuantificamos el número de células caspasa-3-activada<sup>+</sup> en el hipocampo, como se había hecho en el modelo de hipoperfusión, pero no encontramos diferencias en el número de células expresando la caspasa-3-activada en el GD ni en la CG entre los animales sometidos a dieta alta en sodio y los animales con dieta normal, lo que sugiere que el proceso de muerte celular programada inherente a la maduración de las nuevas neuronas no es un factor afectado por la HSD ni contribuyente a los cambios neurogénicos observados.

Como resultado de la neurogénesis hipocampal adulta no solo se generan nuevas neuronas granulares, sino también nuevos astrocitos. Estos astrocitos contribuyen a la homeostasis hipocampal y participan en el soporte de esta estructura. En algunos modelos se ha descrito que cambios en la neurogénesis y en la dinámica de división del nicho neurogénico traen aparejados cambios en la generación de astrocitos por parte de las células progenitoras (Sierra et al., 2015). Según describe Encinas y colaboradores, los astrocitos son generados por las QNPs mediante diferenciación tras tres rondas de división asimétrica hacia ANPs y de auto-renovación, tras las que pierden su capacidad de división (Encinas et al., 2011). Sin embargo, Bonaguidi y colaboradores describen que, aunque una parte de las QNPs se comporta de ese modo, también hay subpoblaciones de QNPs que mantienen su capacidad proliferativa durante toda la vida adulta del ratón, y que los astrocitos pueden ser generados por diferenciación de las QNPs sin ser el paso final de los ciclos de división asimétrica de estas células (Bonaguidi et al., 2012; Bonaguidi et al., 2011). Esta controversia no está aún completamente cerrada, aunque parece que, como defiende Bonaguidi, coexisten poblaciones con capacidad aparentemente ilimitada de auto-renovación con otras que pierden esa capacidad (Bonaguidi et al., 2012). En cualquier caso, la generación de neuronas y astrocitos por parte de las QNPs responde a un programa de división y diferenciación regulado e interconectado, en el que alteraciones en la generación de neuronas pueden afectar a la de astrocitos y viceversa. Por ello, estudiamos el número de astrocitos en el DG y en la SGZ del hipocampo de nuestro modelo. Hallamos que la exposición a cinco semanas de HSD produce un incremento del número de astrocitos en la SGZ y no en la CG. Con este estudio no es posible concluir de forma definitiva que el incremento del número de astrocitos se deba a una mayor diferenciación de los progenitores del nicho hacia este tipo celular, ya que los astrocitos conservan la capacidad de división y pueden generarse a sí mismos. No obstante, el hecho de que el incremento se produzca en una región tan pequeña y específica como la SGZ, y sin incrementar en la capa granular, sugiere una implicación del nicho neurogénico en la generación del exceso de astrocitos.

Este resultado puede ser el efecto combinado de dos fenómenos: 1) un acortamiento del número de divisiones que realiza el conjunto de QNPs que no mantienen su capacidad proliferativa de por vida, acelerando la diferenciación a astrocito como paso final de la activación de este tipo celular, de acuerdo con el modelo de Encinas y mimetizando parcialmente lo ocurrido en el modelo de epilepsia (Sierra et al.,

2015); 2) una mayor decisión de destino celular como astrocito por parte de las QNPs, más acorde con el modelo de Bonaguidi. Ambos procesos pueden complementarse y ambos estarían en consonancia con la reducción del número de ANPs observada tras tres semanas de dieta y la reducción del número de neuroblastos tras cinco semanas de HSD.

#### 2.4.3 El incremento del número de astrocitos en la SGZ causado por la dieta alta en sal perdura en el tiempo hasta las diez semanas de dieta

Cuando evaluamos las poblaciones del nicho neurogénico hipocampal adulto a largo plazo, descubrimos que las diferencias encontradas tras tres semanas de HSD en el número de ANPs, ANPs proliferativas y la ratio ANP/QNP no se mantenían en el tiempo. Ello podría sugerir que el nicho neurogénico pudiera adaptarse al estímulo negativo y recuperar su dinámica de división y diferenciación fisiológica. Sin embargo, al observar el número de astrocitos en la SGZ, no solo se mantenía el incremento, sino que el efecto biológico estimado por la  $\delta$  de Glass aumentó (5 semanas HSD:  $\delta$  de Glass = 2,04; 10 semanas HSD:  $\delta$  de Glass = 2,42), lo que indica que una parte de los efectos del consumo elevado de sodio en la dieta se mantienen en el tiempo, como, por otro lado, indicaban los resultados del deterioro cognitivo.

Podemos interpretar cautelosamente estos datos como que la cronificación del consumo elevado de sodio parece provocar una adaptación parcial del nicho neurogénico hipocampal adulto, de modo que recupera su capacidad de generar nuevas neuronas granulares mientras que eleva la generación de astrocitos derivados de la neurogénesis. Sin embargo, se necesitan más estudios para establecer si realmente el número de neuroblastos se equilibra y recupera, así como para dilucidar los efectos sobre el nicho neurogénico de la sobreproducción astrocitaria mientras se mantiene la generación de ANPs. En caso de que esté mediado por una mayor activación (y salida de la quiescencia) de las QNPs, se podría producir una depleción del nicho, por agotamiento. El número de QNPs similares entre los animales sometidos a ND y HSD indican que esta hipótesis es poco plausible. Si, por el contrario, se lograra incrementar la producción de astrocitos sin necesidad de acelerar la pérdida de QNPs, sino aumentando la capacidad de auto-renovación de estas, sería posible no observar efectos perjudiciales sobre la población progenitora del nicho. De igual modo, es importante seguir explorando los efectos sostenidos de la HSD sobre el número de células DCX<sup>+</sup> y su arborización dendrítica, puesto que la generación final de estas células y su morfología dependen de factores más allá de la dinámica de división y la diferenciación del nicho hipocampal.

### **2.5 Resumen de los efectos del consumo de una dieta alta en sal**

Conjuntamente, los datos del deterioro cognitivo, la neurogénesis hipocampal y la dinámica del nicho sugieren que la HSD provoca un déficit temprano en la recuperación de la memoria episódica contextual, asociado a la alteración de la neurogénesis hipocampal, particularmente a la alteración del árbol dendrítico de los neuroblastos. Previamente a estas alteraciones, la dinámica de división del nicho neurogénico se modifica, generando un menor número de ANPs, en sintonía con la reducción en el número de neuroblastos observado, y elevándose concomitantemente el número de astrocitos.

La dinámica del nicho neurogénico se recupera parcialmente cuando pasan diez semanas de HSD; sin embargo, continúa elevado el número de astrocitos generados. El deterioro cognitivo agravado con el tiempo de dieta alta en sodio apunta a que, a pesar de que la generación de ANPs pueda volver a la normalidad, y quizá también el número de nuevas neuronas granulares producidas, la aberrancia del árbol dendrítico de las neuronas granulares pueda verse intensificada, ya que este parece ser el mecanismo más implicado en la alteración de la memoria episódica contextual, que es dependiente del hipocampo.

Por su parte, el rol que juegan los astrocitos producidos por el nicho continúa siendo una incógnita. Podría tratarse de un mecanismo compensatorio del nicho para incrementar la población de soporte al tejido neuronal ante la caída del flujo (que parece relacionarse con el tiempo en el que se mantiene la dieta), aunque las consecuencias de esta sobreproducción también podrían traer aparejados efectos negativos al alterar el delicado equilibrio hipocampal. La evidencia mostrada en este trabajo sugiere que una parte de los cambios tempranos podrían ser reversibles (reducción de ANPs), sin embargo, este estudio, en consonancia con la literatura, no indica que el deterioro cognitivo pueda revertirse mientras se mantenga el consumo de HSD, como tampoco la generación de astrocitos, que solo incrementa al aumentar las semanas de dieta. Los futuros estudios en este modelo deberán abordar no solo el papel que juegan los astrocitos generados por las células progenitoras neurales\_efs sino también la relación entre el número de neuroblastos, su morfología y el deterioro cognitivo.

### **3. Resumen global**

Los resultados presentados en esta tesis doctoral indican que los modelos empleados, la HSD y la BCAS son dos modelos de deterioro cognitivo vascular con algunos mecanismos semejantes y con una dinámica temporal diferente. La BCAS produce una reducción de flujo de forma directa, y estable en el largo plazo. Por su parte, los efectos de la HSD son más progresivos, y se han explorado a lo largo del tiempo, con un marco temporal de varias semanas tras el inicio de la dieta.

En ambos modelos hallamos una alteración cualitativa y cuantitativa de la neurogénesis, con una reducción en el número de neuroblastos y un acortamiento de la longitud de la dendrita apical de estas nuevas neuronas. Además, ambos modelos generan un deterioro cognitivo hipocampo-dependiente que, en el caso del modelo BCAS, es un fallo de la memoria espacial egocéntrica de trabajo y de la de referencia allocéntrica, mientras que la HSD conduce a una alteración de la memoria episódica contextual. En el contexto de la bibliografía existente, además de la disminución en el número de nuevas neuronas, nuestros datos apuntan a que ambos modelos desencadenan una alteración de la morfología de las células granulares que puede tener consecuencias determinantes sobre el establecimiento de las sinapsis y la circuitería hipocampal, siendo así muy relevante para el adecuado funcionamiento del hipocampo y su desempeño cognitivo, y pudiendo, de este modo, explicar sus alteraciones.

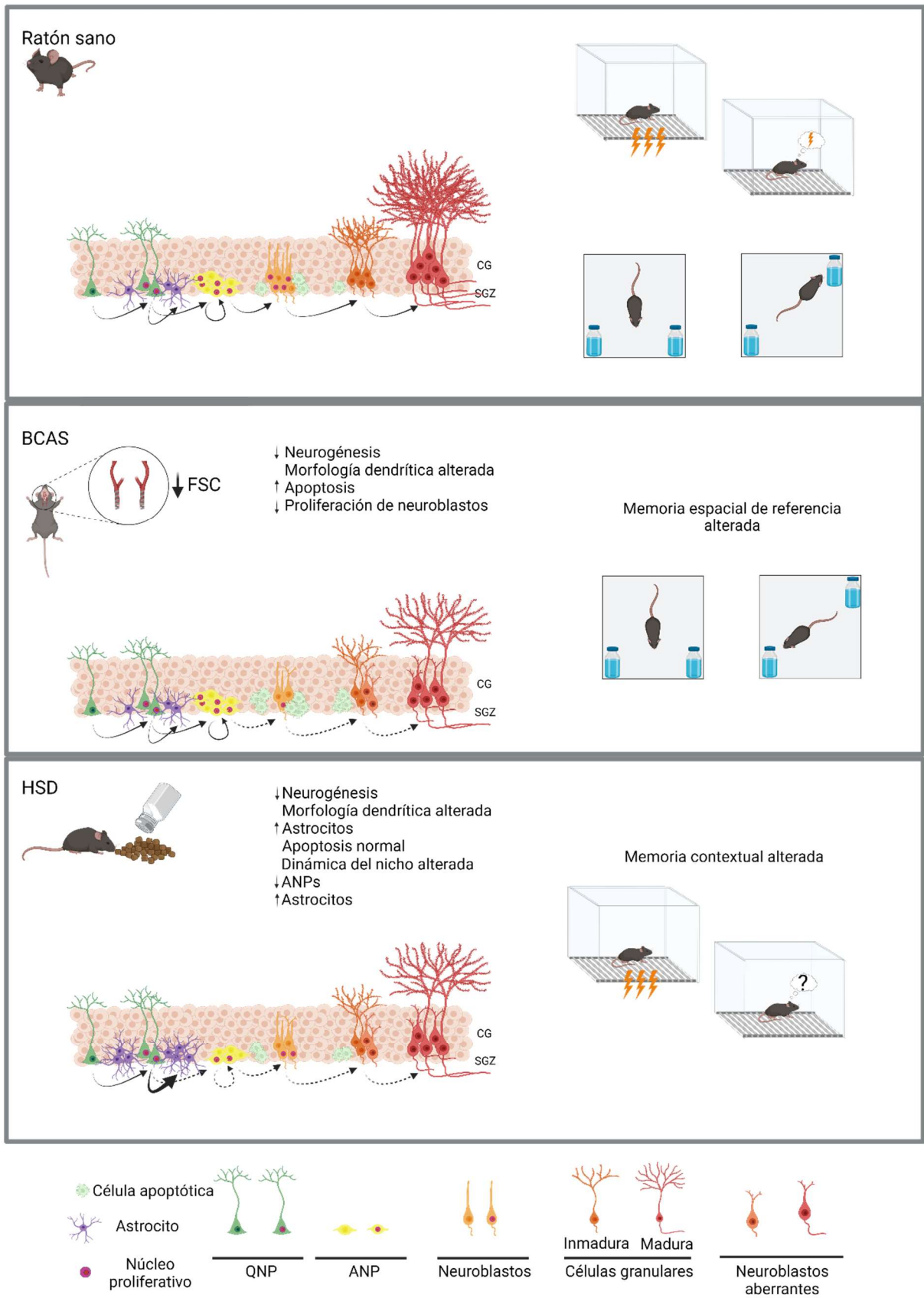


Fig. 37. Resumen gráfico de los resultados del estudio. Se muestran los principales hallazgos en los modelos de hipoperfusión cerebral crónica por estenosis bilateral de las arterias carótidas y de consumo de dieta alta en sodio. ANP: progenitores neurales amplificadores, QNP: progenitores neurales quiescentes.

En el modelo de hipoperfusión cerebral global por BCAS, los mecanismos que podrían contribuir al defecto cuantitativo de nuevas neuronas granulares incluyen una reducción de la proliferación de las células DCX<sup>+</sup> y una mayor apoptosis en el giro dentado. Por su parte, el consumo elevado de sodio podría estar originando una alteración de la dinámica de división del nicho neurogénico hipocampal, reduciéndose el número de progenitores amplificadores generados y aumentando la preferencia por el destino celular de astrocito en lugar de neurona, lo que altera el equilibrio neurona/astrocito en la zona subgranular.

La hipoperfusión inducida por BCAS, además, contribuye al desarrollo de marcadores histopatológicos de la enfermedad de Alzheimer, siendo capaz de incrementar la fosforilación de TAU, promover su insolubilidad y afectar a los procesos de formación y limpieza de las placas de A $\beta$ <sup>+</sup>, por lo que proponemos la hipoperfusión como un factor relevante en el desarrollo y evolución de la enfermedad de Alzheimer.

## Conclusions

1. The BCAS model induces chronic cerebral hypoperfusion, evidenced by a continuous decline in cerebral blood flow between one and three months after surgery, and does not produce signs of hippocampal atrophy or hippocampal inflammation three months after surgery.
2. Cognitive impairment due to chronic cerebral hypoperfusion is concurrent with a reduction in the number of newborn neurons and their abnormal dendritic branching.
3. Chronic cerebral hypoperfusion results in a reduced proliferation of neuroblasts and an increase in cell apoptosis that occur concurrently and may contribute to the reduction in the number of newborn hippocampal neurons.
4. Chronic cerebral hypoperfusion causes an increase in the phosphorylation of TAU (residues Ser199, Ser202, and Thr205) that is selective to the hippocampus and parallels alterations in neurogenesis and spatial memory cognitive impairment.
5. Chronic cerebral hypoperfusion acts as an enhancer of the insolubility of TAU in the hippocampus of APP<sup>NL-F</sup> animals.
6. Cerebral hypoperfusion for three months does not affect working spatial memory in the APP<sup>NL-F</sup> Alzheimer's disease model.
7. Chronic cerebral hypoperfusion contributes to the phosphorylation and insolubility of TAU protein in the hippocampus and to the development and detoxification of  $\beta$ -amyloid plaques in APP<sup>NL-F</sup> mice, potentially playing a relevant role in the pathogenesis of Alzheimer's disease.
8. Consumption of a HSD by mice results in an increase in blood pressure, albeit within normal physiological parameters, a decrease in cerebral blood flow at ten weeks of HSD, and blood-brain barrier dysfunction.
9. Exposure to HSD for five weeks causes a defective hippocampal neurogenesis, resulting in a deficit in the number of new granule neurons and in an alteration of the dendritic tree of neuroblasts, concomitant with deficits in the episodic memory recovery phase.
10. Exposure to HSD causes an early reduction in the generation of ANPs, proliferative ANPs, and the QNP/ANP ratio, which is related to the decrease in observed neurogenesis.
11. The process of programmed cell death inherent to the maturation of new neurons is not affected by HSD and does not contribute to neurogenic changes.
12. Consumption of HSD for five weeks results in a selective increase in the number of astrocytes in the subgranular zone, probably related to the differentiation of QNPs into astrocytes.
13. The generation of ANPs after ten weeks of HSD equals that of animals subjected to a ND, restoring the niche's ability to generate intermediate progenitors that was affected after five weeks of the diet.

14. However, the increase in astrocytes in the subgranular zone persists after ten weeks of HSD consumption.
15. This study, conducted in different models of vascular cognitive impairment (BCAS and HSD), highlights the involvement of the hippocampus and of the adult hippocampal neurogenesis in the alteration of episodic memory, and unravels different underlying mechanisms in each model for the observed changes in immature granule neurons.

## Bibliografía

- Agirman, G., Yu, K. B., & Hsiao, E. Y. (2021). Signaling inflammation across the gut-brain axis. *Science*, 374(6571), 1087-1092. <https://doi.org/10.1126/science.abi6087>
- Akers, K. G., Martinez-Canabal, A., Restivo, L., Yiu, A. P., De Cristofaro, A., Hsiang, H. L., . . . Frankland, P. W. (2014). Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science*, 344(6184), 598-602. <https://doi.org/10.1126/science.1248903>
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124(3), 319-335. <https://doi.org/10.1002/cne.901240303>
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*, 8(6), 429-431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*, 163, 3-22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Andresen, J., Shafi, N. I., & Bryan, R. M. (2006). Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* (1985), 100(1), 318-327. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00937.2005>
- Asadi, A., Shadab Mehr, N., Mohamadi, M. H., Shokri, F., Heidary, M., Sadeghifard, N., & Khoshnood, S. (2022). Obesity and gut-microbiota-brain axis: A narrative review. *J Clin Lab Anal*, 36(5), e24420. <https://doi.org/10.1002/jcla.24420>
- Attwell, D., Buchan, A. M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B. A., & Newman, E. A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 468(7321), 232-243. <https://doi.org/10.1038/nature09613>
- Azarpazhooh, M. R., Avan, A., Cipriano, L. E., Munoz, D. G., Sposato, L. A., & Hachinski, V. (2018). Concomitant vascular and neurodegenerative pathologies double the risk of dementia. *Alzheimers Dement*, 14(2), 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.07.755>
- Baldo, M. P., Brant, L. C. C., Cunha, R. S., Molina, M. D. C. B., Griep, R. H., Barreto, S. M., . . . Mill, J. G. (2019). The association between salt intake and arterial stiffness is influenced by a sex-specific mediating effect through blood pressure in normotensive adults: The ELSA-Brasil study. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 21(12), 1771-1779. <https://doi.org/10.1111/jch.13728>
- Barry Erhardt, E., Pesko, J. C., Prestopnik, J., Thompson, J., Caprihan, A., & Rosenberg, G. A. (2019). Biomarkers identify the Binswanger type of vascular cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab*, 39(8), 1602-1612. <https://doi.org/10.1177/0271678X18762655>

- Belenguer, G., Duart-Abadia, P., Jordán-Pla, A., Domingo-Muelas, A., Blasco-Chamarro, L., Ferrón, S. R., . . . Fariñas, I. (2021). Adult Neural Stem Cells Are Alerted by Systemic Inflammation through TNF- $\alpha$  Receptor Signaling. *Cell Stem Cell*, 28(2), 285-299.e289. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.10.016>
- Benakis, C., Brea, D., Caballero, S., Faraco, G., Moore, J., Murphy, M., . . . Anrather, J. (2016). Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal  $\gamma\delta$  T cells. *Nat Med*, 22(5), 516-523. <https://doi.org/10.1038/nm.4068>
- Bessueille, L., Kawtharany, L., Quillard, T., Goettsch, C., Briolay, A., Taraconat, N., . . . Magne, D. (2023). Inhibition of alkaline phosphatase impairs dyslipidemia and protects mice from atherosclerosis. *Transl Res*, 251, 2-13. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2022.06.010>
- Bink, D. I., Ritz, K., Aronica, E., van der Weerd, L., & Daemen, M. J. (2013). Mouse models to study the effect of cardiovascular risk factors on brain structure and cognition. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(11), 1666-1684. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.140>
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., . . . Mann, J. J. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, 22(4), 589-599.e585. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015>
- Bonaguidi, M. A., Song, J., Ming, G. L., & Song, H. (2012). A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Curr Opin Neurobiol*, 22(5), 754-761. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.03.013>
- Bonaguidi, M. A., Wheeler, M. A., Shapiro, J. S., Stadel, R. P., Sun, G. J., Ming, G. L., & Song, H. (2011). In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 145(7), 1142-1155. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.024>
- Brady, T. M., Horst, G., Appel, L. J., Houry, P. R., & Urbina, E. M. (2022). Dietary sodium intake and sodium load is associated with arterial stiffness in children and young adults. *J Hypertens*, 40(2), 292-299. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000003007>
- Brown, R., Benveniste, H., Black, S. E., Charpak, S., Dichgans, M., Joutel, A., . . . Wardlaw, J. M. (2018). Understanding the role of the perivascular space in cerebral small vessel disease. *Cardiovasc Res*, 114(11), 1462-1473. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy113>
- Bruce-Keller, A. J., Salbaum, J. M., Luo, M., Blanchard, E., Taylor, C. M., Welsh, D. A., & Berthoud, H. R. (2015). Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry*, 77(7), 607-615. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.07.012>
- Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M., & Baker, D. J. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*, 562(7728), 578-582. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0543-y>

- Carvajal, J. A., Germain, A. M., Huidobro-Toro, J. P., & Weiner, C. P. (2000). Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*, 184(3), 409-420. [https://doi.org/10.1002/1097-4652\(200009\)184:3<409::AID-JCP16>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-4652(200009)184:3<409::AID-JCP16>3.0.CO;2-K)
- Chen, J., Cui, X., Zacharek, A., Cui, Y., Roberts, C., & Chopp, M. (2011). White matter damage and the effect of matrix metalloproteinases in type 2 diabetic mice after stroke. *Stroke*, 42(2), 445-452. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.596486>
- Cipolla, M. J. (2009). The Cerebral Circulation. In. <https://doi.org/NBK53081>
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1977). Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol*, 116(2), 207-225. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90213-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90213-3)
- Coltman, R., Spain, A., Tsenkina, Y., Fowler, J. H., Smith, J., Scullion, G., . . . Horsburgh, K. (2011). Selective white matter pathology induces a specific impairment in spatial working memory. *Neurobiol Aging*, 32(12), 2324.e2327-2312. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.005>
- Cuartero, M. I., de la Parra, J., Pérez-Ruiz, A., Bravo-Ferrer, I., Durán-Laforet, V., García-Culebras, A., . . . Moro, M. (2019). Abolition of aberrant neurogenesis ameliorates cognitive impairment after stroke in mice. *J Clin Invest*, 129(4), 1536-1550. <https://doi.org/10.1172/JCI120412>
- Cuartero, M. I., García-Culebras, A., Torres-López, C., Medina, V., Fraga, E., Vázquez-Reyes, S., . . . Moro, M. (2021). Post-stroke Neurogenesis: Friend or Foe? *Front Cell Dev Biol*, 9, 657846. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.657846>
- Da Mesquita, S., Fu, Z., & Kipnis, J. (2018). The Meningeal Lymphatic System: A New Player in Neurophysiology. *Neuron*, 100(2), 375-388. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.022>
- de la Parra, J., Cuartero, M. I., Pérez-Ruiz, A., García-Culebras, A., Martín, R., Sánchez-Prieto, J., . . . Moro, M. A. (2018). AhR Deletion Promotes Aberrant Morphogenesis and Synaptic Activity of Adult-Generated Granule Neurons and Impairs Hippocampus-Dependent Memory. *eNeuro*, 5(4). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0370-17.2018>
- Dearborn, J. L., Zhang, Y., Qiao, Y., Suri, M. F. K., Liu, L., Gottesman, R. F., . . . Wasserman, B. A. (2017). Intracranial atherosclerosis and dementia: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Neurology*, 88(16), 1556-1563. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003837>
- DeFelipe, J., López-Cruz, P. L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larrañaga, P., Anderson, S., . . . Ascoli, G. A. (2013). New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci*, 14(3), 202-216. <https://doi.org/10.1038/nrn3444>
- Dichgans, M., & Leys, D. (2017). Vascular Cognitive Impairment. *Circ Res*, 120(3), 573-591. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308426>

- Dong, Y. F., Kataoka, K., Toyama, K., Sueta, D., Koibuchi, N., Yamamoto, E., . . . Kim-Mitsuyama, S. (2011). Attenuation of brain damage and cognitive impairment by direct renin inhibition in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Hypertension*, 58(4), 635-642. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.173534>
- Dorr, A., Sled, J. G., & Kabani, N. (2007). Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *Neuroimage*, 35(4), 1409-1423. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.12.040>
- Duan, W., Gui, L., Zhou, Z., Liu, Y., Tian, H., Chen, J. F., & Zheng, J. (2009). Adenosine A2A receptor deficiency exacerbates white matter lesions and cognitive deficits induced by chronic cerebral hypoperfusion in mice. *J Neurol Sci*, 285(1-2), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.05.010>
- Duncombe, J., Kitamura, A., Hase, Y., Ihara, M., Kalaria, R. N., & Horsburgh, K. (2017). Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia. *Clin Sci (Lond)*, 131(19), 2451-2468. <https://doi.org/10.1042/CS20160727>
- Encinas, J. M., Michurina, T. V., Peunova, N., Park, J. H., Tordo, J., Peterson, D. A., . . . Enikolopov, G. (2011). Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 8(5), 566-579. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>
- Epp, J. R., Silva Mera, R., Köhler, S., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2016). Neurogenesis-mediated forgetting minimizes proactive interference. *Nat Commun*, 7, 10838. <https://doi.org/10.1038/ncomms10838>
- Evrensel, A., & Ceylan, M. E. (2015). The Gut-Brain Axis: The Missing Link in Depression. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 13(3), 239-244. <https://doi.org/10.9758/cpn.2015.13.3.239>
- Faraco, G., Brea, D., Garcia-Bonilla, L., Wang, G., Racchumi, G., Chang, H., . . . Iadecola, C. (2018). Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response. *Nat Neurosci*, 21(2), 240-249. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0059-z>
- Faraco, G., Hochrainer, K., Segarra, S. G., Schaeffer, S., Santisteban, M. M., Menon, A., . . . Iadecola, C. (2019). Dietary salt promotes cognitive impairment through tau phosphorylation. *Nature*, 574(7780), 686-690. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1688-z>
- Faraco, G., & Iadecola, C. (2013). Hypertension: a harbinger of stroke and dementia. *Hypertension*, 62(5), 810-817. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01063>
- Faraco, G., Park, L., Anrather, J., & Iadecola, C. (2017). Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *J Mol Med (Berl)*, 95(11), 1143-1152. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1573-x>

- Fauran-Clavel, M. J., & Oustrin, J. (1986). Alkaline phosphatase and bone calcium parameters. *Bone*, 7(2), 95-99. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(86\)90680-0](https://doi.org/10.1016/8756-3282(86)90680-0)
- Fierini, F. (2020). Mixed dementia: Neglected clinical entity or nosographic artifice? *J Neurol Sci*, 410, 116662. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.116662>
- Fraga, E., Medina, V., Cuartero, M. I., García-Culebras, A., Bravo-Ferrer, I., Hernández-Jiménez, M., . . . Moro, M. (2023). Defective hippocampal neurogenesis underlies cognitive impairment by carotid stenosis-induced cerebral hypoperfusion in mice. *Front Cell Neurosci*, 17, 1219847. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1219847>
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, 167(4), 897-914. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>
- Gorelick, P. B., Scuteri, A., Black, S. E., Decarli, C., Greenberg, S. M., Iadecola, C., . . . American Heart Association Stroke Council, C. o. E. a. P., Council on Cardiovascular Nursing, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. (2011). Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke*, 42(9), 2672-2713. <https://doi.org/10.1161/STR.0b013e3182299496>
- Graudal, N., Jürgens, G., Baslund, B., & Alderman, M. H. (2014). Compared with usual sodium intake, low- and excessive-sodium diets are associated with increased mortality: a meta-analysis. *Am J Hypertens*, 27(9), 1129-1137. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu028>
- Hachinski, V., Iadecola, C., Petersen, R. C., Breteler, M. M., Nyenhuis, D. L., Black, S. E., . . . Leblanc, G. G. (2006). National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke*, 37(9), 2220-2241. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000237236.88823.47>
- Hachinski, V. C., & Bowler, J. V. (1993). Vascular dementia. *Neurology*, 43(10), 2159-2160; author reply 2160-2151. <https://doi.org/10.1212/wnl.43.10.2159-a>
- Hachinski, V. C., Iliff, L. D., Zilhka, E., Du Boulay, G. H., McAllister, V. L., Marshall, J., . . . Symon, L. (1975). Cerebral blood flow in dementia. *Arch Neurol*, 32(9), 632-637. <https://doi.org/10.1001/archneur.1975.00490510088009>
- Hachinski, V. C., Lassen, N. A., & Marshall, J. (1974). Multi-infarct dementia. A cause of mental deterioration in the elderly. *Lancet*, 2(7874), 207-210. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(74\)91496-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)91496-2)
- Harris, R. J., Symon, L., Branston, N. M., & Bayhan, M. (1981). Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1(2), 203-209. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1981.21>

- Harvey, P. D. (2019). Domains of cognition and their assessment. *Dialogues Clin Neurosci*, 21(3), 227-237. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2019.21.3/pharvey>
- Hattori, Y., Enmi, J., Iguchi, S., Saito, S., Yamamoto, Y., Nagatsuka, K., . . . Ihara, M. (2016). Substantial Reduction of Parenchymal Cerebral Blood Flow in Mice with Bilateral Common Carotid Artery Stenosis. *Sci Rep*, 6, 32179. <https://doi.org/10.1038/srep32179>
- He, W., Goodkin, D., & Kowal, P. (2016). An aging world:2015. In. International Population Reports: U.S. Government Publishing Office.
- Higaki, A., Mogi, M., Iwanami, J., Min, L. J., Bai, H. Y., Shan, B. S., . . . Horiuchi, M. (2018). Beneficial Effect of Mas Receptor Deficiency on Vascular Cognitive Impairment in the Presence of Angiotensin II Type 2 Receptor. *J Am Heart Assoc*, 7(3). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.008121>
- Hoiland, R. L., Caldwell, H. G., Howe, C. A., Nowak-Flück, D., Stacey, B. S., Bailey, D. M., . . . Ainslie, P. N. (2020). Nitric oxide is fundamental to neurovascular coupling in humans. *J Physiol*, 598(21), 4927-4939. <https://doi.org/10.1113/JP280162>
- Hossmann, K. A., Fischer, M., Bockhorst, K., & Hoehn-Berlage, M. (1994). NMR imaging of the apparent diffusion coefficient (ADC) for the evaluation of metabolic suppression and recovery after prolonged cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14(5), 723-731. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1994.93>
- Huang, J. L., Fu, S. T., Jiang, Y. Y., Cao, Y. B., Guo, M. L., Wang, Y., & Xu, Z. (2007). Protective effects of Nicotiflorin on reducing memory dysfunction, energy metabolism failure and oxidative stress in multi-infarct dementia model rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 86(4), 741-748. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.03.003>
- Hunsaker, M. R., & Kesner, R. P. (2013). The operation of pattern separation and pattern completion processes associated with different attributes or domains of memory. *Neurosci Biobehav Rev*, 37(1), 36-58. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.09.014>
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 5(5), 347-360. <https://doi.org/10.1038/nrn1387>
- Iadecola, C. (2013). The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*, 80(4), 844-866. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.008>
- Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, 96(1), 17-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>
- Iadecola, C., Duering, M., Hachinski, V., Joutel, A., Pendlebury, S. T., Schneider, J. A., & Dichgans, M. (2019). Vascular Cognitive Impairment and Dementia: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol*, 73(25), 3326-3344. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.04.034>

- Iadecola, C., & Gottesman, R. F. (2019). Neurovascular and Cognitive Dysfunction in Hypertension. *Circ Res*, 124(7), 1025-1044. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313260>
- Iemolo, F., Duro, G., Rizzo, C., Castiglia, L., Hachinski, V., & Caruso, C. (2009). Pathophysiology of vascular dementia. *Immun Ageing*, 6, 13. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-6-13>
- Iturria-Medina, Y., Sotero, R. C., Toussaint, P. J., Mateos-Pérez, J. M., Evans, A. C., & Initiative, A. s. D. N. (2016). Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat Commun*, 7, 11934. <https://doi.org/10.1038/ncomms11934>
- Iulita, M. F., Noriega de la Colina, A., & Girouard, H. (2018). Arterial stiffness, cognitive impairment and dementia: confounding factor or real risk? *J Neurochem*, 144(5), 527-548. <https://doi.org/10.1111/jnc.14235>
- Jaminon, A., Reesink, K., Kroon, A., & Schurgers, L. (2019). The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in Arterial Remodeling: Focus on Calcification-Related Processes. *Int J Mol Sci*, 20(22). <https://doi.org/10.3390/ijms20225694>
- Janssen, B. J., & Smits, J. F. (2002). Autonomic control of blood pressure in mice: basic physiology and effects of genetic modification. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282(6), R1545-1564. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00714.2001>
- Kadowaki, A., & Quintana, F. J. (2020). The Gut-CNS Axis in Multiple Sclerosis. *Trends Neurosci*, 43(8), 622-634. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.06.002>
- Kawada, N., Imai, E., Karber, A., Welch, W. J., & Wilcox, C. S. (2002). A mouse model of angiotensin II slow pressor response: role of oxidative stress. *J Am Soc Nephrol*, 13(12), 2860-2868. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000035087.11758.ed>
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., & Gage, F. H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130(2), 391-399. <https://doi.org/10.1242/dev.00203>
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., & Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27(8), 447-452. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.013>
- Kempermann, G., Song, H., & Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(9), a018812. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018812>
- Khan, M. B., Hoda, M. N., Vaibhav, K., Giri, S., Wang, P., Waller, J. L., . . . Hess, D. C. (2015). Remote ischemic postconditioning: harnessing endogenous protection in a murine model of vascular cognitive impairment. *Transl Stroke Res*, 6(1), 69-77. <https://doi.org/10.1007/s12975-014-0374-6>

- Kim, S., Kim, H., Yim, Y. S., Ha, S., Atarashi, K., Tan, T. G., . . . Huh, J. R. (2017). Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature*, *549*(7673), 528-532. <https://doi.org/10.1038/nature23910>
- Kim, T. A., Syty, M. D., Wu, K., & Ge, S. (2022). Adult hippocampal neurogenesis and its impairment in Alzheimer's disease. *Zool Res*, *43*(3), 481-496. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2021.479>
- Kirkwood, T. B. (2008). A systematic look at an old problem. *Nature*, *451*(7179), 644-647. <https://doi.org/10.1038/451644a>
- Koike, M. A., Garcia, F. G., Kitazawa, M., Green, K. N., & Laferla, F. M. (2011). Long term changes in phospho-APP and tau aggregation in the 3xTg-AD mice following cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, *495*(1), 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.03.034>
- Koller, A., & Toth, P. (2012). Contribution of flow-dependent vasomotor mechanisms to the autoregulation of cerebral blood flow. *J Vasc Res*, *49*(5), 375-389. <https://doi.org/10.1159/000338747>
- Kraehling, J. R., & Sessa, W. C. (2017). Contemporary Approaches to Modulating the Nitric Oxide-cGMP Pathway in Cardiovascular Disease. *Circ Res*, *120*(7), 1174-1182. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.303776>
- Kuhn, H. G., Biebl, M., Wilhelm, D., Li, M., Friedlander, R. M., & Winkler, J. (2005). Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*, *22*(8), 1907-1915. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04377.x>
- Lacolley, P., Regnault, V., Segers, P., & Laurent, S. (2017). Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease. *Physiol Rev*, *97*(4), 1555-1617. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2017>
- Lamanna, A., Maingard, J., Barras, C. D., Kok, H. K., Handelman, G., Chandra, R. V., . . . Asadi, H. (2019). Carotid artery stenting: Current state of evidence and future directions. *Acta Neurol Scand*, *139*(4), 318-333. <https://doi.org/10.1111/ane.13062>
- Lemke, G., & Huang, Y. (2022). The dense-core plaques of Alzheimer's disease are granulomas. *J Exp Med*, *219*(8). <https://doi.org/10.1084/jem.20212477>
- Li, J., Zou, X., Mao, R., Han, L., Xia, S., Yang, H., . . . Xu, Y. (2023). Determination of the role of hippocampal astrocytes in the bilateral common carotid artery stenosis mouse model by RNA sequencing. *Neurosci Lett*, *805*, 137213. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137213>
- Li, W. Z., Wu, W. Y., Huang, H., Wu, Y. Y., & Yin, Y. Y. (2013). Protective effect of bilobalide on learning and memory impairment in rats with vascular dementia. *Mol Med Rep*, *8*(3), 935-941. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1573>

- Liu, H., & Zhang, J. (2012). Cerebral hypoperfusion and cognitive impairment: the pathogenic role of vascular oxidative stress. *Int J Neurosci*, 122(9), 494-499. <https://doi.org/10.3109/00207454.2012.686543>
- Liu, Q., Bhuiyan, M. I. H., Liu, R., Song, S., Begum, G., Young, C. B., . . . Sun, D. (2021). Attenuating vascular stenosis-induced astrogliosis preserves white matter integrity and cognitive function. *J Neuroinflammation*, 18(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02234-8>
- Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., & Martin-Villalba, A. (2015). Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell*, 17(3), 329-340. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.002>
- Llorens-Martín, M., Rábano, A., & Ávila, J. (2015). The Ever-Changing Morphology of Hippocampal Granule Neurons in Physiology and Pathology. *Front Neurosci*, 9, 526. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00526>
- López-Madróna, V. J., Matias, F. S., Pereda, E., Canals, S., & Mirasso, C. R. (2017). On the role of the entorhinal cortex in the effective connectivity of the hippocampal formation. *Chaos*, 27(4), 047401. <https://doi.org/10.1063/1.4979001>
- Ma, X., Sun, Z., Liu, Y., Jia, Y., Zhang, B., & Zhang, J. (2013). Resveratrol improves cognition and reduces oxidative stress in rats with vascular dementia. *Neural Regen Res*, 8(22), 2050-2059. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.22.004>
- Ma, Y., Shaik, M. A., Kozberg, M. G., Kim, S. H., Portes, J. P., Timerman, D., & Hillman, E. M. (2016). Resting-state hemodynamics are spatiotemporally coupled to synchronized and symmetric neural activity in excitatory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(52), E8463-E8471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525369113>
- Mackeigan, T. P., Morgan, M. L., & Stys, P. K. (2023). Quantitation of Tissue Amyloid via Fluorescence Spectroscopy Using Controlled Concentrations of Thioflavin-S. *Molecules*, 28(11). <https://doi.org/10.3390/molecules28114483>
- Maki, T., Ihara, M., Fujita, Y., Nambu, T., Miyashita, K., Yamada, M., . . . Tomimoto, H. (2011). Angiogenic and vasoprotective effects of adrenomedullin on prevention of cognitive decline after chronic cerebral hypoperfusion in mice. *Stroke*, 42(4), 1122-1128. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.603399>
- Marques, F. Z., Nelson, E., Chu, P. Y., Horlock, D., Fiedler, A., Ziemann, M., . . . Kaye, D. M. (2017). High-Fiber Diet and Acetate Supplementation Change the Gut Microbiota and Prevent the Development of Hypertension and Heart Failure in Hypertensive Mice. *Circulation*, 135(10), 964-977. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024545>
- Martins, I. V., Rivers-Auty, J., Allan, S. M., & Lawrence, C. B. (2017). Mitochondrial Abnormalities and Synaptic Loss Underlie Memory Deficits Seen in Mouse Models of Obesity and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 55(3), 915-932. <https://doi.org/10.3233/JAD-160640>

- Mast, H., Tatemichi, T. K., & Mohr, J. P. (1995). Chronic brain ischemia: the contributions of Otto Binswanger and Alois Alzheimer to the mechanisms of vascular dementia. *J Neurol Sci*, *132*(1), 4-10. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(95\)00116-j](https://doi.org/10.1016/0022-510x(95)00116-j)
- Masuda, A., Kobayashi, Y., Kogo, N., Saito, T., Saido, T. C., & Itohara, S. (2016). Cognitive deficits in single App knock-in mouse models. *Neurobiol Learn Mem*, *135*, 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.07.001>
- Mayer, E. A., Nance, K., & Chen, S. (2022). The Gut-Brain Axis. *Annu Rev Med*, *73*, 439-453. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042320-014032>
- McLean, F. H., Grant, C., Morris, A. C., Horgan, G. W., Polanski, A. J., Allan, K., . . . Williams, L. M. (2018). Rapid and reversible impairment of episodic memory by a high-fat diet in mice. *Sci Rep*, *8*(1), 11976. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30265-4>
- Mestre, H., Kostrikov, S., Mehta, R. I., & Nedergaard, M. (2017). Perivascular spaces, glymphatic dysfunction, and small vessel disease. *Clin Sci (Lond)*, *131*(17), 2257-2274. <https://doi.org/10.1042/CS20160381>
- Mestre, H., Mori, Y., & Nedergaard, M. (2020). The Brain's Glymphatic System: Current Controversies. *Trends Neurosci*, *43*(7), 458-466. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.04.003>
- Mies, G., Ishimaru, S., Xie, Y., Seo, K., & Hossmann, K. A. (1991). Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, *11*(5), 753-761. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1991.132>
- Ming, G. L., & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, *28*, 223-250. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459>
- Miyamoto, N., Maki, T., Pham, L. D., Hayakawa, K., Seo, J. H., Mandeville, E. T., . . . Arai, K. (2013). Oxidative stress interferes with white matter renewal after prolonged cerebral hypoperfusion in mice. *Stroke*, *44*(12), 3516-3521. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.002813>
- Miyanojara, J., Kakae, M., Nagayasu, K., Nakagawa, T., Mori, Y., Arai, K., . . . Kaneko, S. (2018). TRPM2 Channel Aggravates CNS Inflammation and Cognitive Impairment via Activation of Microglia in Chronic Cerebral Hypoperfusion. *J Neurosci*, *38*(14), 3520-3533. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2451-17.2018>
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., . . . Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med*, *25*(4), 554-560. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>

- Mott, D. D., Turner, D. A., Okazaki, M. M., & Lewis, D. V. (1997). Interneurons of the dentate-hilus border of the rat dentate gyrus: morphological and electrophysiological heterogeneity. *J Neurosci*, *17*(11), 3990-4005. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-11-03990.1997>
- Márquez-Valadez, B., Rábano, A., & Llorens-Martín, M. (2022). Progression of Alzheimer's disease parallels unusual structural plasticity of human dentate granule cells. *Acta Neuropathol Commun*, *10*(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01431-7>
- Nakaji, K., Ihara, M., Takahashi, C., Itohara, S., Noda, M., Takahashi, R., & Tomimoto, H. (2006). Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents. *Stroke*, *37*(11), 2816-2823. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000244808.17972.55>
- Nation, D. A., Sweeney, M. D., Montagne, A., Sagare, A. P., D'Orazio, L. M., Pachicano, M., . . . Zlokovic, B. V. (2019). Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat Med*, *25*(2), 270-276. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0297-y>
- Nishio, K., Ihara, M., Yamasaki, N., Kalaria, R. N., Maki, T., Fujita, Y., . . . Tomimoto, H. (2010). A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke*, *41*(6), 1278-1284. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.581686>
- O'Brien, J. T., Erkinjuntti, T., Reisberg, B., Roman, G., Sawada, T., Pantoni, L., . . . DeKosky, S. T. (2003). Vascular cognitive impairment. *Lancet Neurol*, *2*(2), 89-98. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(03\)00305-3](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(03)00305-3)
- Park, H. R., Park, M., Choi, J., Park, K. Y., Chung, H. Y., & Lee, J. (2010). A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett*, *482*(3), 235-239. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.07.046>
- Pluta, R., Ułamek-Kozioł, M., Januszewski, S., & Czuczwar, S. J. (2018). Tau Protein Dysfunction after Brain Ischemia. *J Alzheimers Dis*, *66*(2), 429-437. <https://doi.org/10.3233/JAD-180772>
- Qiu, L., Ng, G., Tan, E. K., Liao, P., Kandiah, N., & Zeng, L. (2016). Chronic cerebral hypoperfusion enhances Tau hyperphosphorylation and reduces autophagy in Alzheimer's disease mice. *Sci Rep*, *6*, 23964. <https://doi.org/10.1038/srep23964>
- Raz, L., Bhaskar, K., Weaver, J., Marini, S., Zhang, Q., Thompson, J. F., . . . Rosenberg, G. A. (2019). Hypoxia promotes tau hyperphosphorylation with associated neuropathology in vascular dysfunction. *Neurobiol Dis*, *126*, 124-136. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.07.009>
- Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., . . . Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, *472*(7344), 466-470. <https://doi.org/10.1038/nature09817>

- Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Itohara, S., . . . Saido, T. C. (2014). Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, *17*(5), 661-663. <https://doi.org/10.1038/nn.3697>
- Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., . . . Mazmanian, S. K. (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*, *167*(6), 1469-1480.e1412. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>
- Sanchez-Aguilera, A., Wheeler, D. W., Jurado-Parras, T., Valero, M., Nokia, M. S., Cid, E., . . . Ascoli, G. A. (2021). An update to Hippocampome.org by integrating single-cell phenotypes with circuit function in vivo. *PLoS Biol*, *19*(5), e3001213. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001213>
- Santisteban, M. M., & Iadecola, C. (2018). Hypertension, dietary salt and cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab*, *38*(12), 2112-2128. <https://doi.org/10.1177/0271678X18803374>
- Savage, J. C., Carrier, M., & Tremblay, M. (2019). Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease. *Methods Mol Biol*, *2034*, 13-26. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9658-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9658-2_2)
- Schaeffer, S., & Iadecola, C. (2021). Revisiting the neurovascular unit. *Nat Neurosci*, *24*(9), 1198-1209. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00904-7>
- Sehgel, N. L., Sun, Z., Hong, Z., Hunter, W. C., Hill, M. A., Vatner, D. E., . . . Meininger, G. A. (2015). Augmented vascular smooth muscle cell stiffness and adhesion when hypertension is superimposed on aging. *Hypertension*, *65*(2), 370-377. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04456>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, *8*(6), 595-608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Shapiro, L. A., Upadhyaya, P., & Ribak, C. E. (2007). Spatiotemporal profile of dendritic outgrowth from newly born granule cells in the adult rat dentate gyrus. *Brain Res*, *1149*, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.07.032>
- Shi, Y., Thrippleton, M. J., Blair, G. W., Dickie, D. A., Marshall, I., Hamilton, I., . . . Wardlaw, J. M. (2020). Small vessel disease is associated with altered cerebrovascular pulsatility but not resting cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab*, *40*(1), 85-99. <https://doi.org/10.1177/0271678X18803956>
- Shibata, M., Ohtani, R., Ihara, M., & Tomimoto, H. (2004). White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*, *35*(11), 2598-2603. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000143725.19053.60>
- Shibata, M., Yamasaki, N., Miyakawa, T., Kalaria, R. N., Fujita, Y., Ohtani, R., . . . Tomimoto, H. (2007). Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*, *38*(10), 2826-2832. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.490151>

- Shih, A. Y., Blinder, P., Tsai, P. S., Friedman, B., Stanley, G., Lyden, P. D., & Kleinfeld, D. (2013). The smallest stroke: occlusion of one penetrating vessel leads to infarction and a cognitive deficit. *Nat Neurosci*, *16*(1), 55-63. <https://doi.org/10.1038/nn.3278>
- Sierra, A., Martín-Suárez, S., Valcárcel-Martín, R., Pascual-Brazo, J., Aelvoet, S. A., Abiega, O., . . . Encinas, J. M. (2015). Neuronal hyperactivity accelerates depletion of neural stem cells and impairs hippocampal neurogenesis. *Cell Stem Cell*, *16*(5), 488-503. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.04.003>
- Siesjö, B. K. (1992). Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg*, *77*(2), 169-184. <https://doi.org/10.3171/jns.1992.77.2.0169>
- Skrobot, O. A., Attems, J., Esiri, M., Hortobágyi, T., Ironside, J. W., Kalaria, R. N., . . . Love, S. (2016). Vascular cognitive impairment neuropathology guidelines (VCING): the contribution of cerebrovascular pathology to cognitive impairment. *Brain*, *139*(11), 2957-2969. <https://doi.org/10.1093/brain/aww214>
- Skrobot, O. A., Black, S. E., Chen, C., DeCarli, C., Erkinjuntti, T., Ford, G. A., . . . group, V. (2018). Progress toward standardized diagnosis of vascular cognitive impairment: Guidelines from the Vascular Impairment of Cognition Classification Consensus Study. *Alzheimers Dement*, *14*(3), 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.09.007>
- Soares, L. M., Schiavon, A. P., Milani, H., & de Oliveira, R. M. (2013). Cognitive impairment and persistent anxiety-related responses following bilateral common carotid artery occlusion in mice. *Behav Brain Res*, *249*, 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.010>
- Solfrizzi, V., & Panza, F. (2014). Mediterranean diet and cognitive decline. A lesson from the whole-diet approach: what challenges lie ahead? *J Alzheimers Dis*, *39*(2), 283-286. <https://doi.org/10.3233/JAD-130831>
- Song, J., Yang, L., Nan, D., He, Q., Wan, Y., & Guo, H. (2018). Histidine Alleviates Impairments Induced by Chronic Cerebral Hypoperfusion in Mice. *Front Physiol*, *9*, 662. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00662>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., . . . Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, *555*(7696), 377-381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Stevenson, W., Hase, Y., Wilson, E., Hollins, A., Hase, M., Ennaceur, A., . . . Kalaria, R. N. (2020). Long-term effects of experimental carotid stenosis on hippocampal infarct pathology, neurons and glia and amelioration by environmental enrichment. *Brain Res Bull*, *163*, 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.07.014>

- Stranahan, A. M., Norman, E. D., Lee, K., Cutler, R. G., Telljohann, R. S., Egan, J. M., & Mattson, M. P. (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*, 18(11), 1085-1088. <https://doi.org/10.1002/hipo.20470>
- Strickland, S. (2018). Blood will out: vascular contributions to Alzheimer's disease. *J Clin Invest*, 128(2), 556-563. <https://doi.org/10.1172/JCI97509>
- Sweeney, M. D., Kisler, K., Montagne, A., Toga, A. W., & Zlokovic, B. V. (2018). The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci*, 21(10), 1318-1331. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0234-x>
- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*, 99(1), 21-78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>
- Tarantini, S., Tran, C. H. T., Gordon, G. R., Ungvari, Z., & Csiszar, A. (2017). Impaired neurovascular coupling in aging and Alzheimer's disease: Contribution of astrocyte dysfunction and endothelial impairment to cognitive decline. *Exp Gerontol*, 94, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.11.004>
- Tatu, L., & Vuillier, F. (2014). Structure and vascularization of the human hippocampus. *Front Neurol Neurosci*, 34, 18-25. <https://doi.org/10.1159/000356440>
- Tecuatl, C., Wheeler, D. W., Sutton, N., & Ascoli, G. A. (2021). Comprehensive Estimates of Potential Synaptic Connections in Local Circuits of the Rodent Hippocampal Formation by Axonal-Dendritic Overlap. *J Neurosci*, 41(8), 1665-1683. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1193-20.2020>
- Tobin, M. K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W. G., . . . Lazarov, O. (2019). Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. *Cell Stem Cell*, 24(6), 974-982.e973. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.05.003>
- Toda, T., & Gage, F. H. (2018). Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res*, 373(3), 693-709. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2735-4>
- Toda, T., Parylak, S. L., Linker, S. B., & Gage, F. H. (2019). The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Mol Psychiatry*, 24(1), 67-87. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0036-2>
- Toth, P., Tarantini, S., Csiszar, A., & Ungvari, Z. (2017). Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 312(1), H1-H20. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00581.2016>
- Vanlandewijck, M., He, L., Mäe, M. A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., . . . Betsholtz, C. (2018). Author Correction: A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature*, 560(7716), E3. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0232-x>

- Venkat, P., Chopp, M., & Chen, J. (2015). Models and mechanisms of vascular dementia. *Exp Neurol*, 272, 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.05.006>
- Villeda, S. A., Luo, J., Mosher, K. I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., . . . Wyss-Coray, T. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, 477(7362), 90-94. <https://doi.org/10.1038/nature10357>
- Wang, J., Zhang, H. Y., & Tang, X. C. (2010). Huperzine a improves chronic inflammation and cognitive decline in rats with cerebral hypoperfusion. *J Neurosci Res*, 88(4), 807-815. <https://doi.org/10.1002/jnr.22237>
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(5), 1858-1862. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>
- Wheeler, D. W., White, C. M., Rees, C. L., Komendantov, A. O., Hamilton, D. J., & Ascoli, G. A. (2015). Hippocampome.org: a knowledge base of neuron types in the rodent hippocampus. *Elife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.09960>
- White, C. M., Rees, C. L., Wheeler, D. W., Hamilton, D. J., & Ascoli, G. A. (2020). Molecular expression profiles of morphologically defined hippocampal neuron types: Empirical evidence and relational inferences. *Hippocampus*, 30(5), 472-487. <https://doi.org/10.1002/hipo.23165>
- Wolters, F. J., & Ikram, M. A. (2019). Epidemiology of Vascular Dementia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39(8), 1542-1549. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.311908>
- Wu, Y. T., Beiser, A. S., Breteler, M. M. B., Fratiglioni, L., Helmer, C., Hendrie, H. C., . . . Brayne, C. (2017). The changing prevalence and incidence of dementia over time - current evidence. *Nat Rev Neurol*, 13(6), 327-339. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.63>
- Zhang, F., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K. K., & Iadecola, C. (1997). Increased susceptibility to ischemic brain damage in transgenic mice overexpressing the amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 17(20), 7655-7661. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-20-07655.1997>
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645-660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>
- Zhao, Y., Gu, J. H., Dai, C. L., Liu, Q., Iqbal, K., Liu, F., & Gong, C. X. (2014). Chronic cerebral hypoperfusion causes decrease of O-GlcNAcylation, hyperphosphorylation of tau and behavioral deficits in mice. *Front Aging Neurosci*, 6, 10. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00010>