

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Demencia vascular: búsqueda de dianas terapéuticas en un
modelo preclínico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Violeta Medina Alonso

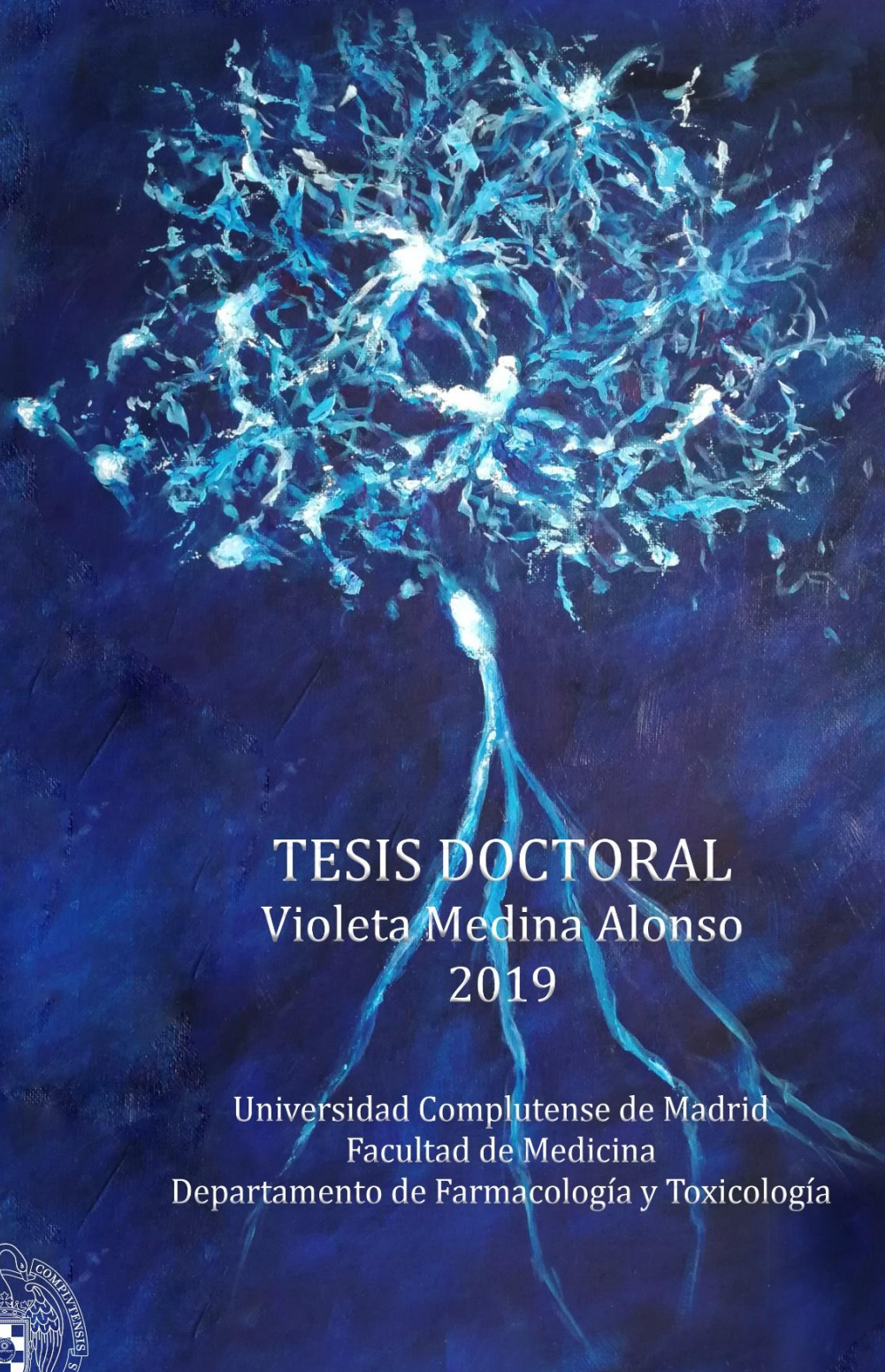
Directores

María Ángeles Moro Sánchez
Ignacio Lizasoain Hernández
Macarena Hernández Jiménez

Madrid

© Violeta Medina Alonso, 2019

Demencia Vascolar: Búsqueda de dianas terapéuticas en un modelo preclínico



TESIS DOCTORAL
Violeta Medina Alonso
2019

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología y Toxicología



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

DIRECTORES

María Ángeles Moro Sánchez
Ignacio Lizasoain Hernández
Macarena Hernández Jiménez

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología y Toxicología



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

**DEMENCIA VASCULAR: BÚSQUEDA DE DIANAS
TERAPÉUTICAS EN UN MODELO PRECLÍNICO**

Tesis doctoral de:

Violeta Medina Alonso

Directores de Tesis

María Ángeles Moro Sánchez

Ignacio Lizasoain Hernández

Macarena Hernández Jiménez

Madrid, 2019

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología y Toxicología



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

**DEMENCIA VASCULAR: BÚSQUEDA DE
DIANAS TERAPÉUTICAS EN UN MODELO
PRECLÍNICO**

Violeta Medina Alonso

Tesis Doctoral

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Violeta Medina Alonso,
estudiante en el Programa de Doctorado Investigación biomédica,
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Demencia vascular: Búsqueda de dianas terapéuticas en un modelo preclínico

y dirigida por: María Ángeles Moro Sánchez, Ignacio Lizasoain Hernández
y Macarena Hernández Jiménez

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 22 de JULIO de 2019

Fdo.: VIOLETA MEDINA ALONSO

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Memoria presentada por Dña. Violeta Medina Alonso
para optar al grado de Doctor por la Universidad
Complutense de Madrid.

La presente tesis doctoral ha sido financiada por los
proyectos SAF2015-68632-R y SAF2016-81716-
REDC del Ministerio de Economía y Competitividad,
los proyectos FIS PI17/01601 y RETICS
RD12/0014/0003 del Instituto de Salud Carlos III y el
Programa de Formación del Profesorado
Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y
Deporte (FPU01405265).

**"Hazlo o no lo hagas, pero no lo
intentas"**

-Yoda

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
RESUMEN	17
ABSTRACT	20
INTRODUCCIÓN	23
1.1. Breve historia del deterioro cognitivo: de demencia a deterioro cognitivo vascular	25
1.2. Mecanismos fisiopatológicos del deterioro cognitivo vascular	27
1.3. El cerebro no lo es todo. La importancia del eje intestino-cerebro	31
1.4. La sal, enemiga de la memoria. Los efectos de una dieta alta en sodio	33
1.5. El hipocampo adulto	34
1.5.1. Localización anatómica y vascularización.....	34
1.5.2. Estructura.....	37
1.5.3. Circuito hipocampal.....	38
1.5.4. Neurogénesis hipocampal adulta.....	39
1.5.4.1. Neurogénesis adulta, una historia de controversia.....	39
1.5.4.2. El nicho neurogénico hipocampal.....	41
1.5.5. Formación de la memoria en el hipocampo.....	43
1.6. Neuroinflamación y respuesta inmune periférica	45
1.6.1. Microglía.....	45
1.6.2. El receptor TLR4 como director de la orquesta inflamatoria.....	47
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
2.1. Hipótesis	49
2.2. Objetivos	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1. Normativa y animales de experimentación	55
3.2. Modelos animales	55
3.2.1. Modelo de estenosis bilateral de las arterias carótidas (BCCAs).....	55
3.2.2. Modelo de dieta alta en sodio (HSD).....	56

3.3. Tests comportamentales.....	57
3.4. Registros <i>in vivo</i>.....	62
3.4.1. Medida del flujo sanguíneo cerebral.....	62
3.4.2. Medida de la presión arterial y niveles sanguíneos de Na ⁺	63
3.4.3. Resonancia magnética (DTI).....	63
3.4.4. Tratamiento con bromodesoxiuridina (BrdU).....	64
3.5. Técnicas experimentales y determinaciones.....	64
3.5.1. Sacrificio de los animales y obtención de muestras.....	64
3.5.2. Técnicas experimentales.....	65
3.6. Análisis estadístico.....	71
3.7. Diseño experimental.....	72
RESULTADOS.....	73
4.1. Caracterización de los déficits cognitivos asociados al modelo BCCAs.....	75
4.1.1. Alteraciones de la memoria dependiente de hipocampo en el modelo BCCAs.....	75
4.1.2. Alteraciones motoras en el modelo BCCAs.....	77
4.1.3. Evaluación de comportamientos de ansiedad y depresión en el modelo BCCAs.....	78
4.2. Estudio de mecanismos implicados en el deterioro cognitivo en el modelo BCCAs como posibles dianas terapéuticas.....	80
4.2.1. Evaluación del daño isquémico y alteraciones anatómicas hipocampales.....	80
4.2.2. Evaluación de la integridad de la sustancia blanca en el modelo BCCAs.....	82
4.2.3. Caracterización de la neurogénesis hipocampal en el modelo BCCAs.....	83
4.2.4. Alteraciones neuroinflamatorias: respuesta microglial en el hipocampo.....	89
4.2.5. Alteraciones vasculares.....	93
4.2.6. Estudio de marcadores periféricos: NETosis en plasma.....	96
4.3. Caracterización del déficit cognitivo en el modelo HSD.....	97
4.4. Estudio de mecanismos implicados en el deterioro cognitivo en el modelo HSD como posibles dianas terapéuticas.....	98
4.4.1. Evaluación del daño isquémico y alteraciones anatómicas hipocampales.....	98

4.4.2. Caracterización de la neurogénesis hipocampal en el modelo HSD.....	100
4.4.3. Alteraciones neuroinflamatorias: respuesta microglial en el hipocampo.....	103
4.4.4. Alteraciones vasculares.....	107
4.4.5. Marcadores periféricos: tensión arterial y niveles plasmáticos de Na ⁺	109
4.4.6. Estudio de la reversibilidad del déficit tras regreso a dieta normal.....	110
4.4.6.1. Déficit cognitivo.....	110
4.4.6.2. Neurogénesis hipocampal.....	111
4.5. Estudio del papel del receptor TLR4 en el modelo HSD.....	113
4.5.1. Evaluación del déficit cognitivo asociado al modelo HSD en ratones TLR4 ^{-/-}	113
4.5.2. Evaluación de las alteraciones hipocampales asociadas al modelo HSD en ratones TLR4 ^{-/-}	114
4.5.3. Caracterización de la neurogénesis hipocampal en animales TLR4 ^{-/-}	115
4.5.4. Alteraciones neuroinflamatorias: respuesta microglial en el hipocampo en animales TLR4 ^{-/-}	116
4.5.5. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica.....	121
4.5.6. Evaluación de las alteraciones en marcadores periféricos asociado al modelo HSD en ratones TLR4 ^{-/-}	122
4.5.6.1. Perfil de diferenciación de los linfocitos T hacia Th17.....	122
4.5.6.2. Evaluación de los niveles de citoquinas circulantes.....	123
4.5.6.3. NETosis en plasma.....	124
DISCUSIÓN.....	125
CONCLUSIONES.....	145
BIBLIOGRAFÍA.....	149

ABREVIATURAS

3MS *Modified Mini Mental State Evaluation*

A β Proteína β -amiloide

ACA Arteria cerebral anterior

ACM Arteria cerebral media

AComP Arteria comunicante posterior

AhR Receptor de hidrocarburos aromáticos

AMPs Amplifying neural progenitors

APP Proteína precursora amiloide

BCCAs *Bilateral common carotid artery stenosis*

BHE Barrera hematoencefálica

BLBP Brain lipid-binding protein

BrdU Bromodesoxiuridina

BSA *Bovine serum albumin*

CA *Cornu ammonis*

CBA *Cytometric Bead Array*

CD (número) Cluster de diferenciación

CE Corteza entorrinal

CFC *Contextual fear conditioning*

CG Capa granular

CM Capa molecular

DAMPs *Damage-Associated Molecular Patterns*

DCV Deterioro cognitivo vascular

DCX Doblecortina

DI Diámetro interno

DTI Imágenes de tensor de difusión

EA Enfermedad de Alzheimer

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

EPI Secuencias ecoplanares

EROs Especies Reactivas de Oxígeno

ERNs Especies Reactivas de Nitrógeno

FA Fracción de anisotropía

FACS Selección de Células por Fluorescencia Activada - Citometría de flujo

FSC Flujo sanguíneo cerebral

GD Giro dentado

GFAP Proteína ácida fibrilar de la glía

HMGB1 *High movility group box 1*

HSD *High sodium diet*

Iba-1 Molécula adaptadora de unión a calcio tipo 1

IFN Interferón

IgG Inmunoglobulina G

IL-2 Interleuquina 2

IL-4 Interleuquina 4

IL-6 Interleuquina 6

IL-10 Interleuquina 10

IL-17 Interleuquina 17

IRF Factor Regulador de Interferón

L Longitud

LTP Potenciación a largo plazo

MAP Proteína activada por mitógeno

MMPs Metaloproteasas de matriz

NMDA N-Metil-D-Aspartato

ND Normal diet

NLO Nueva localización de objeto

NO Óxido nítrico

NETs *Neutrophil extracellular traps*

NeuN Núcleo neuronal

NF-κB Factor nuclear κB

NSCs Neural stem cells

OMS Organización mundial de la salud

PAMPs *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PBS Tampón Fosfato Salino

PE Ficoeritrina

PECAM-1 *Platelet endothelial cell adhesion molecule 1*

PercP Proteína peridinin clorofila

PIB Producto interior bruto

PMA Forbol 12-miristato 14-acetato

PRRs Pattern Recognition Receptors

RNA_m RNA mensajero

RON Reconocimiento de objeto nuevo

RPMI Medio Roswell Park Memorial Institute

RSV *Respiratory Syncytial virus*

SNC Sistema Nervioso Central

SSC Dispersión lateral

TCR Receptor de linfocitos T

TE Tiempo de eco

Th Linfocitos T helper

TLR (número) *Toll like receptor*

TLRs Receptores tipo toll

TNF *Tumor necrosis factor*

TR Tiempo de repetición

TRIF Factor derivado de Interferón asociado al Receptor Toll

TP Tracto perforante

WT *Wild Type*

ZSG Zona subgranular

RESUMEN

El término deterioro cognitivo vascular (DCV) se emplea para englobar diferentes trastornos cuyo origen es exclusivamente vascular, cubriendo un amplio espectro que abarca desde el deterioro cognitivo leve hasta un estado de demencia severa. Los primeros síntomas del deterioro cognitivo leve suelen aparecer como un enlentecimiento de las funciones cognitivas, que a menudo suelen pasar desapercibidos, progresando hacia una demencia en la que la persona necesita asistencia constante para realizar las tareas cotidianas. Este nivel de discapacidad y dependencia que la demencia genera en el paciente acarrea un impacto a nivel familiar, con unos elevados costes médicos, lo que hace que sea considerada una prioridad de salud pública, imponiéndose por ello la necesidad de hallar estrategias capaces de frenar el desarrollo y el progreso del DCV.

En este sentido, el aporte de flujo sanguíneo al cerebro (FSC) resulta clave en el correcto funcionamiento de la actividad cerebral, por lo que alteraciones vasculares capaces de reducir este aporte pueden tener un gran impacto en el procesamiento cognitivo (Iadecola 2013). Una de las alteraciones vasculares más frecuentes es la estenosis de las arterias carótidas comunes, provocada por la acumulación de placas de ateroma, que genera un descenso global del flujo sanguíneo cerebral sostenido en el tiempo que se conoce como hipoperfusión cerebral crónica. Este estado de hipoperfusión desencadena una serie de respuestas a nivel cerebral que se encuentran probablemente implicadas en la pérdida de las funciones cognitivas, como son el estrés oxidativo y la activación de una respuesta inflamatoria, ambos con efectos deletéreos para la función y supervivencia neuronal (Liu and Zhang 2012, Wang et al. 2010).

Otro factor capaz de afectar a los niveles de FSC es la dieta, siendo varios los componentes de la dieta descritos con capacidad de modificar sus niveles (Joris et al. 2018). Actualmente, el descubrimiento de la existencia de una interacción entre el sistema digestivo y el cerebro ha puesto el interés en el posible efecto de la dieta sobre las funciones cognitivas. Concretamente, se ha descrito recientemente cómo una dieta alta en sodio (*high sodium diet*, HSD) provoca un descenso del FSC asociado a una pérdida de las capacidades cognitivas (Faraco et al. 2018).

Sin embargo, independientemente de cuál sea la causa del descenso del FSC, los mecanismos responsables del DCV descritos hasta el momento resultan inespecíficos y, en general, no prestan demasiada atención al hipocampo, estructura clave en los procesos de memoria. En este sentido, la neurogénesis hipocampal adulta se postula como candidato interesante que podría estar contribuyendo al desarrollo del DCV, ya que se ha descrito su participación en otras patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA) o la demencia post-ictus (Cuartero et al. 2019, Llorens-Martin et al. 2013, Moreno-Jimenez et al. 2019, Tobin et al.

2019). Además, otro candidato que podría participar en el DCV es el receptor de la inmunidad innata TLR4. TLR4 es uno de los miembros de la familia de receptores *Toll-like* (TLRs), que se encuentra expresado en células del sistema inmune como los linfocitos o la microglía (Reynolds et al. 2012, Vaure and Liu 2014), participando en el control de procesos inflamatorios, uno de los principales mecanismos descritos en el contexto del DCV.

Con estos antecedentes, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, nos propusimos la siguiente hipótesis: "El hipocampo es una estructura clave en los procesos de memoria, por lo que alteraciones en procesos fisiológicos como la neurogénesis o la respuesta inflamatoria pueden ser responsables, al menos en parte, del DCV. Además, por su implicación en ambos procesos, el receptor TLR4 podría participar en el desarrollo del DCV".

Para la verificación de dicha hipótesis, hemos utilizado dos modelos de DCV: un modelo de hipoperfusión cerebral por medio de la colocación de *microcoils* en las arterias carótidas (bilateral common carotid artery stenosis, BCCAs; (Shibata et al. 2004) y un modelo de dieta alta en sodio (Faraco et al. 2018). Asimismo, hemos utilizado ratones C57BL/6J de fenotipo salvaje (wild type, WT), y ratones transgénicos B6.B10ScN-*Tlr4*^{flps-de1}/JthJ, carentes del receptor TLR4 (TLR4^{-/-}). La evaluación cognitiva de los animales se llevó a cabo mediante diferentes tests de comportamiento. La caracterización tanto de la neurogénesis como de la neuroinflamación se realizó mediante técnicas de inmunofluorescencia en cortes de cerebro. Por último, para el análisis de la respuesta inmune periférica mediante la determinación de varias citoquinas se utilizó tanto la técnica de *cytometric bead array* (CBA) con citometría de flujo.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran la implicación de la neurogénesis hipocampal adulta en el desarrollo del DCV. A nivel cerebral hemos encontrado una disminución del número de neuroblastos concomitante con la aparición de déficits cognitivos en ambos modelos, sin que se aprecien signos de lesiones isquémicas o atrofia hipocampal.

En el caso del modelo HSD, la dieta resulta un factor externo fácilmente modificable sin la necesidad de recurrir a tratamientos farmacológicos, por lo que decidimos evaluar si las alteraciones en la neurogénesis, así como el deterioro cognitivo resultaban ser reversibles tras regresar a una dieta normal (*normal diet*, ND). Sorprendentemente, encontramos que a pesar de que las alteraciones neurogénicas sí resultan reversibles, el déficit cognitivo, evaluado por medio de un protocolo retrógrado, no es reversible tras el regreso a una dieta normal.

Dado que la neuroinflamación es una de las características patológicas del DCV y puede, además, afectar a la respuesta neurogénica, decidimos evaluar la activación microglial en el hipocampo, encontrando una mayor activación de la microglía en ambos modelos, que podría estar contribuyendo al descenso en el número de neuroblastos y/o a la aparición de déficits cognitivos.

Por último, quisimos determinar el posible papel del receptor TLR4 en el modelo HSD. Para ello utilizamos ratones carentes del receptor TLR4. Los resultados presentados en esta tesis doctoral ponen de manifiesto que los efectos de una dieta HSD, tanto a nivel cognitivo como cerebral, no están presentes en los animales TLR4^{-/-}. Además, el mecanismo responsable de esta protección frente a los efectos de la dieta HSD en los animales TLR4^{-/-} resulta ser la incapacidad de estos animales de desarrollar una respuesta inmune periférica, caracterizada por un aumento de los niveles plasmáticos de IL-17, que sí ocurre en los animales WT y que se ha descrito como mediadora de los efectos de la dieta HSD en el eje intestino-cerebro (Faraco et al. 2018).

El conjunto de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral indica que tanto la neurogénesis hipocampal adulta como la activación microglial son posibles dianas terapéuticas en el desarrollo del DCV. Además, nuestros datos señalan que el receptor TLR4 tiene un papel esencial en la respuesta inmune periférica característica de la dieta HSD y, con ello, en la aparición del déficit cognitivo asociado a un consumo elevado de sal.

ABSTRACT

The concept of vascular cognitive impairment (VCI) was introduced in order to include under the same term different pathologies associated to vascular disease, ranging from mild cognitive impairment to dementia. Early signs of cognitive impairment normally consist of slower cognitive functions, which frequently goes unnoticed, and progresses to a state of dementia where the person needs constant assistance for daily tasks, such as eating, dressing or walking. The level of dependence and disability that dementia causes in a patient comes with an important family impact and also high medical costs, which makes dementia a public health priority with an urgent need to find different strategies in order to stop or slow the development of VCI.

In this regard, blood supply to the brain results of crucial importance in order to maintain a correct functioning of cerebral activity and, therefore, any vascular alterations that could disturb this supply have an important impact on cognitive function (Iadecola, 2013). One of the most frequent vascular alterations is the stenosis of the carotid arteries, caused by accumulation of atheroma plaques, which generates a maintained global reduction of cerebral perfusion. This process, known as chronic cerebral hypoperfusion, triggers a series of events on the brain which are probably related to the loss of cognitive function, such as oxidative stress and the activation of an immune response, both compromising neuronal function and survival (Liu and Zhang 2012, Wang et al. 2010).

Another factor that can alter blood supply to the brain is diet. Several dietary factors with the ability to modify cerebral perfusion have been described (Joris et al. 2018). Currently, the discovery of the existence of a connection between the brain and the intestine through a gut-brain axis has highlighted the importance of dietary habits on cognitive function. Specifically, it has been recently described that a high sodium diet (HSD) causes a reduction on cerebral blood flow which is associated to an impaired cognitive function (Faraco et al., 2018).

However, regardless of the source of the reduction on blood supply, the mechanisms responsible for VCI described so far remain vague and hardly specific. Moreover, authors generally pay little attention to the hippocampus, a key structure on memory processes. In this regard, adult hippocampal neurogenesis arises as an interesting candidate which could contribute to the development of VCI, as it has been implicated in similar pathologies such as Alzheimer disease (AD) or post-stroke dementia (Cuartero et al. 2019, Llorens-Martin et al. 2013, Moreno-Jimenez et al. 2019, Tobin et al. 2019). Additionally, another candidate that could be involved in VCI is the immune receptor TLR4. TLR4 is a member of the family of Toll-like receptors (TLRs), which is expressed in immune cells such as lymphocytes or microglia (Reynolds et al. 2012, Vaure and Liu 2014) and participates on the regulation of inflammatory processes.

With this background, for the execution of this Doctoral Thesis, we proposed the following hypothesis: "Due to the importance of the hippocampus in memory cognition, any alterations on its physiological processes, such as neurogenesis or inflammation, may be responsible, at least in part, for the development of VCI. Moreover, considering the participation of TLR4 on both processes, this immune receptor could be involved on the development of VCI".

For testing this hypothesis, we used two different models of VCI: a model of cerebral hypoperfusion by bilateral common carotid artery stenosis (BCCAs) using microcoils (Shibata et al. 2004) and a model of high sodium diet (Faraco et al., 2018). Besides, we used wild type (WT) C57BL/6J mice and B6.B10ScN-*Tlr4*^{lps-del}/JthJ mice, lacking TLR4 (TLR4^{-/-}). Cognitive evaluation was performed by different behavioural tests. Characterization of neurogenesis and neuroinflammation was carried out through immunofluorescence in brain slices. Finally, the evaluation of peripheral immune response was accomplished by cytometric bead array (CBA) and flow cytometry.

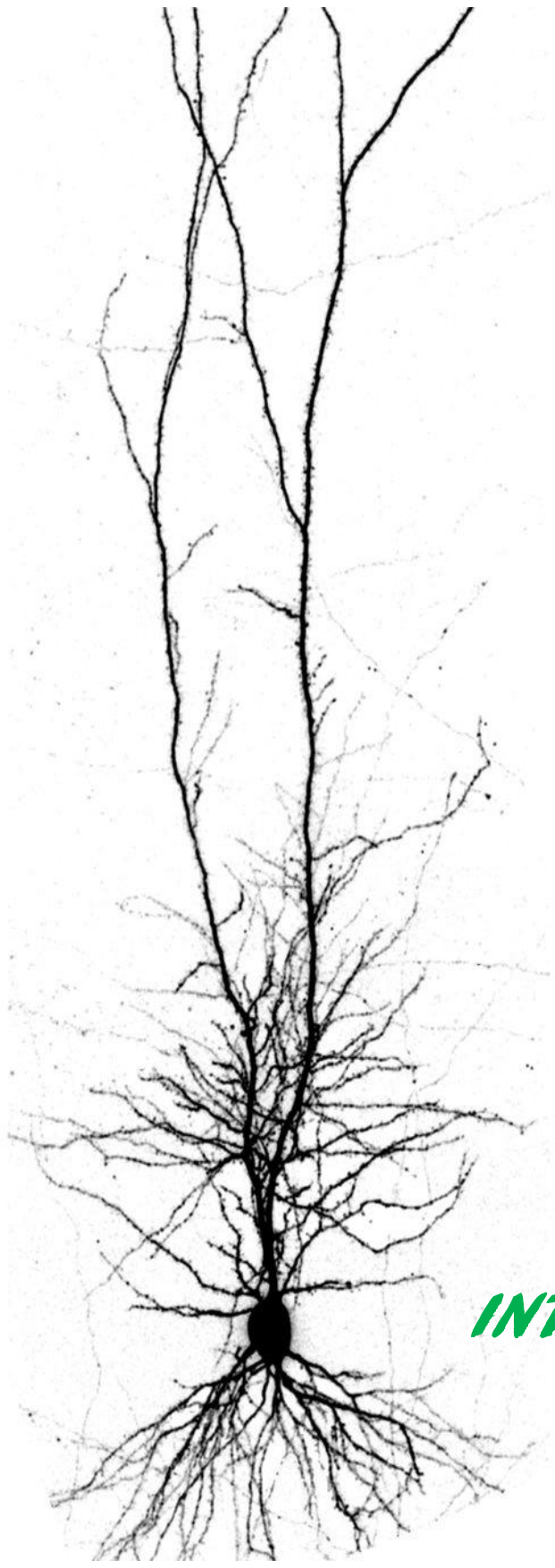
The results obtained in this Doctoral Thesis show the contribution of adult hippocampal neurogenesis to the development of VCI. At the brain level, we have found a reduction on the number of neuroblasts, concomitant to cognitive deficits in both models, with no signs of ischemic lesions or hippocampal atrophy.

Regarding the HSD model, diet is an external factor that can be easily modified without any pharmacological treatment. Therefore, we decided to evaluate whether the alterations seen on hippocampal neurogenesis as well as the cognitive deficits were reversible by returning to a normal diet (ND). Surprisingly, we found that, even though the neurogenic alterations were reversible, the cognitive deficit, evaluated by a retrograde protocol, was not reversible after returning to a ND.

Given the importance of neuroinflammation on VCI and as it can influence neurogenesis and neuroblasts survival, we evaluated microglial activation in the hippocampus in both models. We found an increased microglial activation in both, BCCAs and HSD models, which could be partly responsible for the decrease in neuroblasts numbers and/or the cognitive deficits observed.

Finally, we aimed to determine the possible role of TLR4 on the HSD model. For this, we used mice lacking TLR4 receptor. The results presented in this Doctoral Thesis demonstrate that neither the cognitive nor the hippocampal effects of HSD present on WT animals appear on TLR4^{-/-} animals. Moreover, the mechanism responsible for this protection seen on TLR4^{-/-} animals appears to be the inability of these mice to develop a peripheral immune response, characterized by increased IL-17 plasma levels. This immune response has been described on WT animals and mediates the effects of HSD through the gut-brain axis (Faraco et al. 2018).

The set of results presented in this Doctoral Thesis indicates that adult hippocampal neurogenesis and microglial activation are plausible therapeutic targets in the development of VCI. Moreover, our results indicate that TLR4 has a key role on the peripheral immune response characteristic of HSD and, therefore, on the cognitive deficit associated to a high salt consumption.



INTRODUCCIÓN

1.1. Breve historia del deterioro cognitivo: de demencia a deterioro cognitivo vascular

La organización mundial de la salud (OMS) define la **demencia** como "un síndrome, generalmente de naturaleza progresiva, caracterizado por el deterioro de la función cognitiva (es decir, la capacidad para procesar el pensamiento) más allá de lo que podría considerarse una consecuencia del envejecimiento normal. La demencia afecta a la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio, sin que la conciencia sea afectada. El deterioro de la función cognitiva suele ir acompañado, y en ocasiones es precedido, por el deterioro del control emocional, el comportamiento social o la motivación" (OMS, 2017).

Los primeros síntomas de la demencia suelen aparecer como un enlentecimiento de las funciones cognitivas, que a menudo suelen pasar desapercibidos. Esto progresa hacia la aparición de pequeños olvidos que, aunque en un principio pueden parecer causa de un envejecimiento normal, terminan formando parte de un cuadro de demencia grave, en el que los problemas ejecutivos y de memoria provocan que la persona necesite asistencia constante para realizar tareas como vestirse o preparar la comida. En este estadio pueden aparecer además cambios emocionales, como labilidad o depresión, así como la pérdida de funciones psicomotoras, como caminar o hablar.

A pesar de no ser una consecuencia del envejecimiento normal o fisiológico, la demencia afecta principalmente a personas mayores y su aparición se relaciona con la edad. Actualmente la OMS calcula que a nivel mundial 50 millones de personas sufren demencia, registrándose cada año cerca de 10 millones de nuevos casos. Esto supone que entre un 5% y un 8% de la población mayor de 60 años sufrirá demencia en algún momento (OMS, 2019). El progresivo envejecimiento poblacional que sufren los países desarrollados supone que se estime que estas cifras se tripliquen para el año 2050.

Estos datos hacen que la demencia sea considerada como uno de los retos sanitarios del siglo XXI, no solamente por su impacto en la salud, sino también por el enorme gasto socioeconómico que supone. El nivel de discapacidad y dependencia que la demencia genera en el paciente acarrea un impacto a nivel familiar, con unos costes médicos que a nivel mundial ascendieron en 2015 a 818.000 millones de dólares, lo que equivale a un 1,1% del producto interior bruto (PIB) mundial (OMS, 2017).

Por esta razón, la demencia es reconocida como una prioridad de salud pública y se están desarrollando diversos planes tanto a nivel mundial como nacional que promuevan la sensibilización con la enfermedad, así como diversas iniciativas políticas destinadas a promover la reducción del riesgo de demencia, su diagnóstico, tratamiento y atención, además de la investigación o el apoyo a los cuidadores de las personas con demencia (OMS, 2017).

Sin embargo, el concepto de demencia ha cambiado considerablemente a lo largo de los años. En los tiempos de Alois Alzheimer, y durante gran parte del siglo XX, se aceptaba que la demencia era causada fundamentalmente por un "endurecimiento de las arterias", lo que hoy conocemos como demencia arteriosclerótica (Bowler 2007). Esta visión se mantuvo hasta la década de 1980, con el descubrimiento del péptido beta amiloide ($A\beta$) como componente principal de las placas encontradas en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA). Tras este descubrimiento rápidamente se identificaron mutaciones en la proteína precursora amiloide (APP) causantes de las variantes familiares de la EA (Bertram and Tanzi 2008). Esto supuso un cambio de paradigma en el que todo el interés se centró en el péptido $A\beta$, en un proceso conocido como "Alzheimerización de la demencia" (Bowler 2007). No obstante, en años posteriores, ya a finales del siglo XX, se volvió a poner de manifiesto la importancia de las alteraciones cerebrovasculares en el deterioro cognitivo, con diversos estudios que señalan que la mayoría de pacientes presentan una demencia mixta, con tanto características de Alzheimer (placas de $A\beta$) como lesiones isquémicas (Esiri et al. 1999, Snowden et al. 1997).

Actualmente, para referirse a la patología de origen cerebrovascular, se emplea el término **deterioro cognitivo vascular (DCV)**, definido como "un síndrome con evidencia clínica de infarto cerebral o lesiones cerebrovasculares subclínicas con deterioro cognitivo que afecta, al menos, a un dominio cognitivo" (Gorelick et al. 2011). De esta forma, se engloban bajo esta denominación diversos trastornos cuyo origen es exclusivamente vascular, cubriendo un amplio espectro desde un deterioro cognitivo leve hasta un estado de demencia severa (**Figura 1**). El deterioro cognitivo vascular es responsable de, al menos, el 20% de los casos de demencia, solo por detrás de la EA, aunque como se ha señalado previamente, la contribución vascular en ésta también es un factor muy importante.

Por todo lo anteriormente mencionado, y al tratarse de una enfermedad muy poco estudiada hasta el momento, especialmente en comparación con la atención que recibe la EA; la caracterización de los procesos neuropatológicos que subyacen al DCV no solo es necesaria, sino que supone la base para el diseño de estrategias terapéuticas que limiten el desarrollo y la progresión de la demencia vascular.

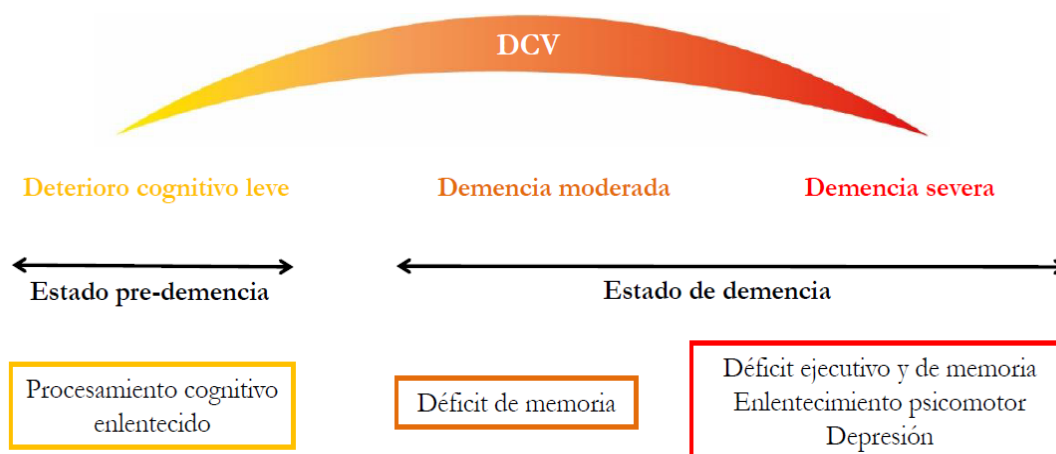


Figura 1. Representación del espectro del deterioro cognitivo vascular.

1.2. Mecanismos fisiopatológicos del deterioro cognitivo vascular

El cerebro requiere de un continuo aporte sanguíneo debido a sus altas demandas de energía y a que carece de reservas energéticas, por lo que la función y la estructura vascular juegan un papel muy importante en la función cognitiva (Iadecola 2004). En el adulto, el consumo de oxígeno por parte del cerebro supone el 20% de todo el organismo, mientras que proporcionalmente su tamaño solo supone un 2%. Esta alta demanda metabólica se satisface de modo que una desproporcionada cantidad del gasto cardiaco (15-20%) es dirigido al cerebro (Kety 1950, Neghlig 1996). Además, el flujo sanguíneo cerebral (FSC) se encuentra altamente regulado y coordinado con la actividad sináptica. La activación neuronal genera cambios hemodinámicos que aumentan el flujo sanguíneo con una alta precisión espacio-temporal. Tanto es así que estos cambios hemodinámicos son ampliamente utilizados para localizar la actividad neuronal *in vivo* en técnicas de imagen funcional (Attwell and Iadecola 2002). Esto pone de manifiesto la importancia del aporte sanguíneo para el correcto funcionamiento de la actividad cerebral, e indica a la vez que alteraciones en este aporte pueden tener un gran impacto en el procesamiento cognitivo. Las alteraciones vasculares que pueden darse son muy diversas, variando desde obstrucciones o estenosis de las arterias carótidas comunes, que afectan globalmente a la perfusión cerebral, hasta microinfartos o microsangrados que tienen lugar en vénulas o arteriolas de pequeño calibre, pasando por infartos en arterias mayores que pueden desencadenar la demencia post-infarto (Iadecola 2013) (Figura 2).

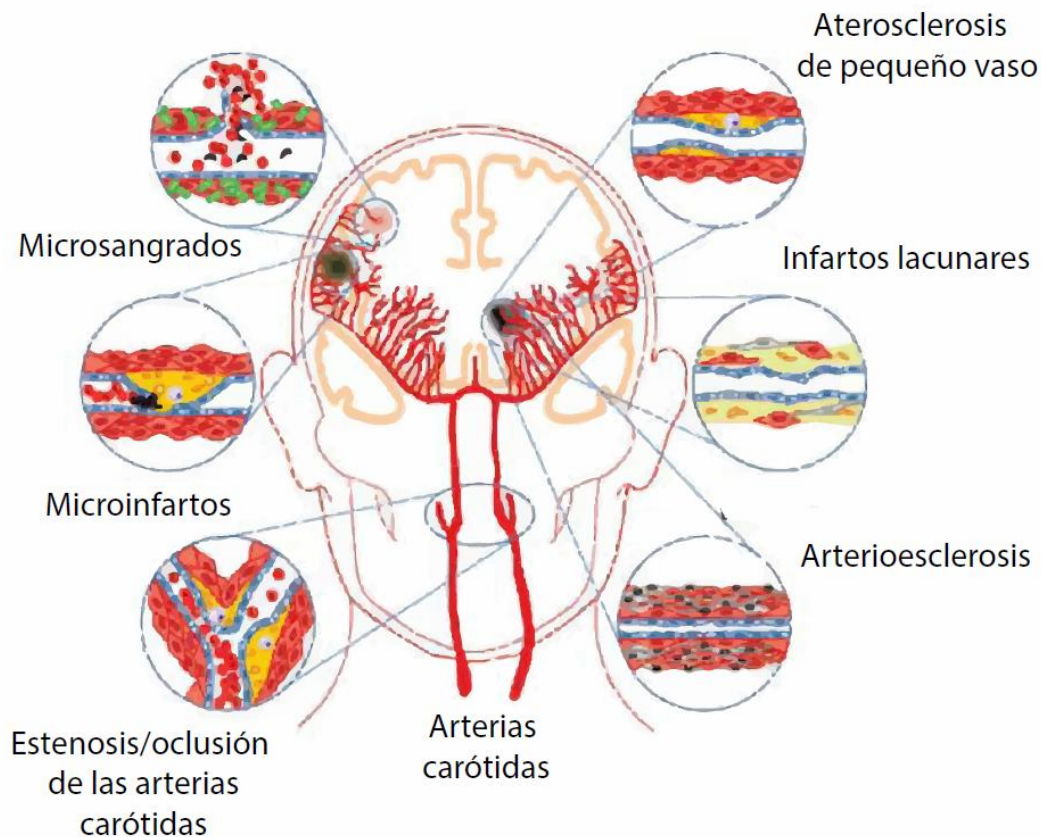


Figura 2. Principales procesos fisiopatológicos desencadenantes del deterioro cognitivo vascular. (Adaptado de Iadecola, 2013).

En el contexto de esta tesis doctoral nos centraremos en los eventos que se desencadenan debido a un descenso global de la perfusión cerebral mantenido de forma crónica, lo que se conoce como **hipoperfusión cerebral crónica**. A pesar de que, como se ha mencionado anteriormente, las causas de la hipoperfusión cerebral son variadas, la más común es la estenosis de las arterias carótidas comunes, los principales vasos que nutren el cerebro. Esta estenosis es causada mayoritariamente por la acumulación de placas de ateroma que estrechan la luz del vaso sanguíneo, reduciendo así el flujo. Generalmente, esta acumulación resulta asintomática, por lo que la hipoperfusión cerebral puede permanecer oculta manteniéndose e incrementándose a lo largo de los años hasta la aparición de los primeros síntomas (Lamanna et al. 2019). El grado de estenosis considerado de importancia clínica varía según las guías consultadas, pero suele establecerse en un 50-60%, con una prevalencia de aproximadamente un 1% en la población mayor de 65 años (Wolff et al. 2007), mientras que la prevalencia de estenosis asintomática severa (>70%) llega a ser de un 3,1% (de Weerd et al. 2010). Es por tanto importante controlar los factores de riesgo, como *diabetes mellitus*, hipertensión, hiperlipidemia y tabaquismo, con el fin de limitar la aparición de la enfermedad (Baumgart et al. 2015).

La reducción global de la perfusión cerebral por debajo de un cierto nivel puede provocar déficits cognitivos independientemente de la aparición de lesiones isquémicas (Marshall et al. 2012). Concretamente, reducciones del FSC en un 40-60% se asocian con un descenso de la actividad neuronal y con deterioro cognitivo, ambos reversibles si se restablecen los valores normales de FSC (Marshall 2012, Marshall et al. 1999, Tatemichi et al. 1995). Aunque aún no se conocen con exactitud los mecanismos fisiopatológicos del deterioro cognitivo vascular, sí se conocen una serie de procesos que se desencadenan como respuesta al descenso del FSC y que están probablemente implicados en la pérdida de funciones cognitivas, como son la hipoxia, el estrés oxidativo y la activación de una respuesta inflamatoria (Figura 3). Así, se acepta que la hipoxia y el estrés oxidativo provocan disfunción mitocondrial (que incrementa, a su vez, el estrés oxidativo), daño y apoptosis neuronal, así como la producción y liberación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres (Li W. Z. et al. 2013, Ma et al. 2013). Este desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes supone un ambiente que produce daño tanto a las células endoteliales como a la glía y las neuronas. Esto provoca un desacoplamiento de la unidad neurovascular lo que, debido a la estrecha relación existente entre actividad neuronal y el FSC, potencia la reducción de éste y el estado hipóxico (Liu and Zhang 2012). Esta hipoxia puede, además, provocar la muerte celular y la disfunción de la vasculatura, dañando la barrera hematoencefálica (BHE) y potenciando así la respuesta neuroinflamatoria (Gill et al. 2010). Por otra parte, se sabe que factores proinflamatorios como las metaloproteasas de matriz (MMPs), las interleuquinas (IL-1 e IL-6, entre otras), el factor de necrosis tumoral (TNF α), los receptores tipo Toll (TLRs), el interferón (IFN), y la activación de la vía del complemento, entre otros, provocan también un aumento de la permeabilidad de la BHE, incrementan el daño en la sustancia blanca (desmielinización, pérdida axonal y degeneración de oligodendrocitos) así como la muerte neuronal y la activación microglial (Candelario-Jalil et al. 2011, Wang et al. 2010). Concretamente, la activación de la cascada inflamatoria en el hipocampo afecta tanto la neurogénesis como la proliferación de progenitores neurales, la plasticidad sináptica y la densidad de espinas dendríticas, lo que finalmente desencadena déficits en tareas de memoria y aprendizaje dependientes del hipocampo (Park et al. 2010, Stranahan et al. 2008). No obstante, es necesario tener en cuenta que todo lo descrito hasta momento comprende mecanismos generales e inespecíficos, posiblemente insuficientes para explicar el amplio espectro de las diferentes formas de deterioro cognitivo vascular.

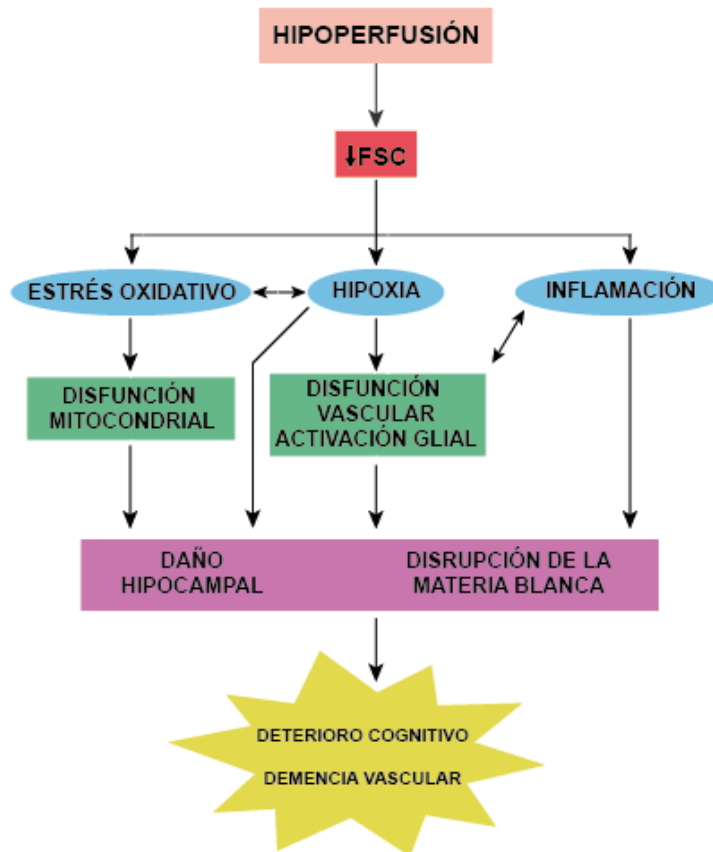


Figura 3. Principales mecanismos fisiopatológicos del deterioro cognitivo vascular. (Adaptado de Venkat et al., 2015)

Por el momento no existe ningún tratamiento específico para el deterioro cognitivo vascular. Los únicos fármacos que se han empleado son algunos de los diseñados para el tratamiento de la EA o aquellos enfocados a disminuir el riesgo cardiovascular, como las estatinas. No obstante, estos tratamientos consiguen un beneficio muy limitado y solamente son de alguna utilidad en los primeros estadios de la enfermedad (Venkat et al. 2015). Algunos ejemplos de fármacos empleados en EA y que han conseguido mejorar la capacidad cognitiva de los pacientes con demencia vascular son los inhibidores de acetilcolinesterasa, como el *donepezilo*, o antagonistas del receptor de N-Metil-D-Aspartato (NMDA), como la *memantina* (Orgogozo et al. 2002, Wilkinson et al. 2010). Estudios con animales muestran efectos positivos de compuestos como *resveratrol*, tanto por sus efectos antioxidantes como antiinflamatorios (Li X. M. et al. 2014, Ma et al. 2013), *cilostazol*, capaz de mejorar el daño en la materia blanca, aunque sus mecanismos aún no están claramente establecidos (Ohtomo et al. 2018) o el bloqueante de los canales de calcio *nimodipino*, con actividad neuroprotectora (Hu et al. 2017).

Dada la escasez de tratamientos específicos disponibles actualmente para el deterioro cognitivo vascular, resulta de suma importancia el profundizar en los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan el déficit cognitivo con el fin de esclarecer nuevas dianas terapéuticas.

1.3. El cerebro no lo es todo. La importancia del eje intestino-cerebro.

Tradicionalmente se ha considerado al cerebro como el único responsable de las enfermedades neuropsiquiátricas. Sin embargo, durante los últimos años se ha comenzado a desterrar la idea de que el cerebro es un órgano aislado del resto del organismo y a prestar atención a factores externos que pueden tener influencia en el sistema nervioso central. Es el caso del llamado "**eje intestino-cerebro**", término acuñado para describir la relación entre el sistema digestivo y el cerebro (**Figura 4**). Con la introducción en la investigación de los ratones libres de patógenos se han multiplicado los estudios que relacionan la microbiota intestinal con trastornos psiquiátricos como el estrés, la ansiedad, la depresión o el autismo (Desbonnet et al. 2014, Diaz Heijtz et al. 2011, Evrensel and Ceylan 2015, Neufeld et al. 2011, Sudo et al. 2004). Conviene resaltar que el interés no se centra solamente en el campo de la psiquiatría, sino que el eje intestino-cerebro también ha sido implicado en patologías como la isquemia cerebral o la enfermedad de Parkinson (Benakis et al. 2016, Sampson et al. 2016).

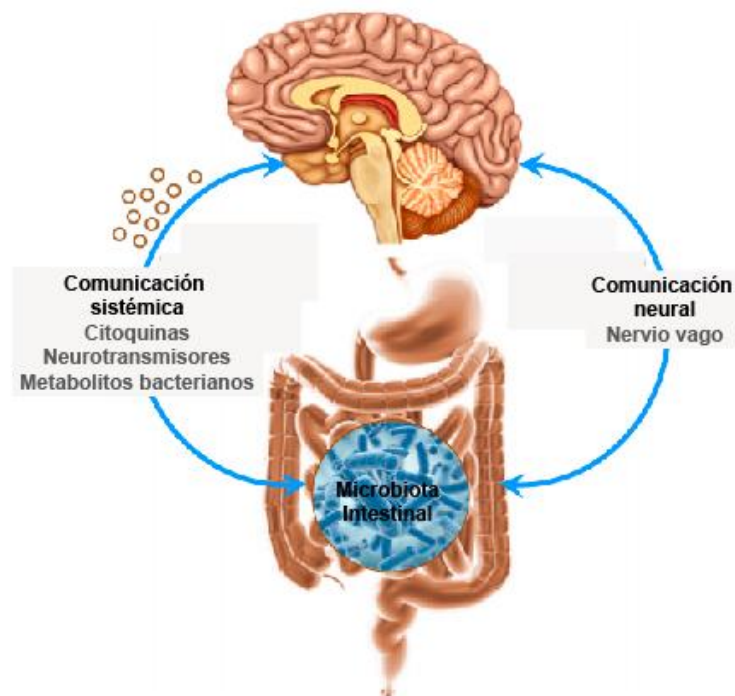


Figura 4. Comunicación entre cerebro e intestino en el eje intestino-cerebro. (Adaptado de (Mayer et al. 2014))

La comunicación entre cerebro e intestino que propone el eje intestino-cerebro es de carácter bidireccional, existiendo además dos vías de comunicación: una a través del nervio vago y otra por medio de la circulación sistémica (Bravo et al. 2011). Así, en el intestino, por parte de la microbiota puede alterarse la producción de neurotransmisores como la serotonina o ciertos metabolitos bacterianos, a la vez que pueden producirse cambios en la permeabilidad de la barrera intestinal o en la respuesta inmune de la mucosa (Ait-Belgnaoui et al. 2014, Clarke et al. 2013, Hooper et al. 2001, Verdu et al. 2006). Estos cambios, por medio de la circulación sistémica, pueden desencadenar un efecto a nivel cerebral (**Figura 5**).

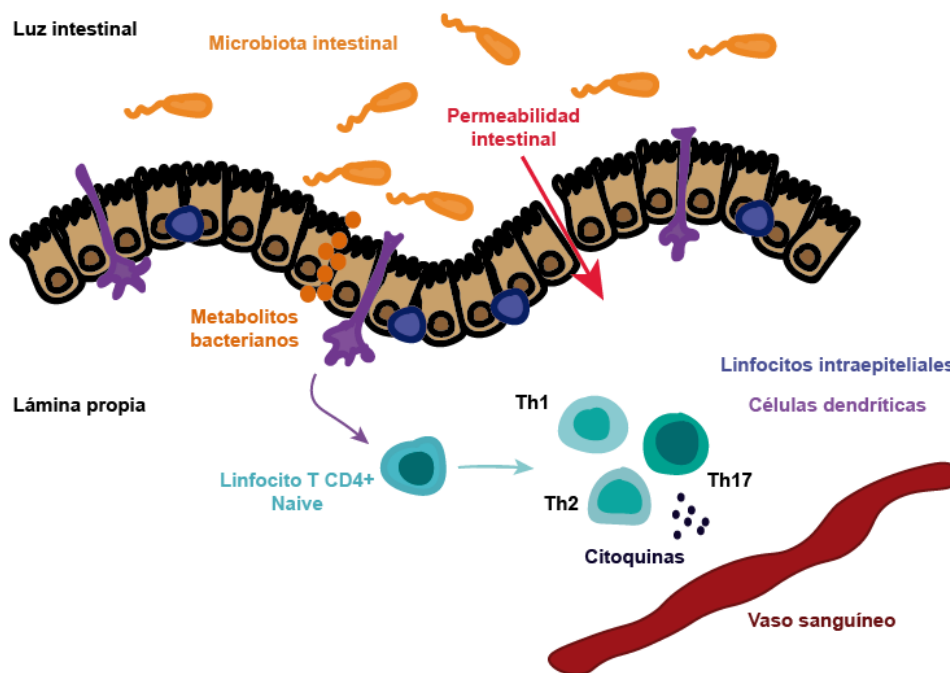


Figura 5. Cambios que tienen lugar a nivel intestinal en el eje intestino-cerebro.

Teniendo en cuenta esta comunicación existente entre sistema digestivo y cerebro, cobra especial relevancia el estudio de las implicaciones que el patrón alimentario de un individuo pueda tener a nivel cognitivo y cerebral. En este sentido, cada vez son más numerosos los estudios que relacionan una dieta alta en grasas con déficits de memoria en el contexto tanto de la obesidad como en la EA (Knight et al. 2014, Martins et al. 2017, McLean et al. 2018, Noble et al. 2014, Toyama et al. 2015).

Por otra parte, no solamente se están comenzando a estudiar los efectos de una dieta alta en grasas, sino que las posibles relaciones existentes entre otros estilos dietarios, como la dieta mediterránea, el consumo de ácidos grasos omega-3, la restricción calórica o la ingesta de flavonoides, y la función cognitiva también son dianas de estudio actualmente (Freemantle et al. 2006, Gillette-Guyonnet and Vellas 2008, Rendeiro et al. 2009, Solfrizzi et al. 2011).

Dada la creciente relevancia que está cobrando el estudio de la relación entre la dieta y el deterioro cognitivo, en el contexto de esta tesis doctoral también nos centraremos en el papel que pueda jugar otro de los patrones alimentarios prevalentes en los países occidentales, las dietas altas en sodio.

1.4. La sal, enemiga de la memoria. Los efectos de una dieta alta en sodio.

El **exceso de sal** en la dieta es uno de los principales problemas alimentarios de los países occidentales. Debido a que su consumo se ha relacionado con patologías de origen cardiovascular, como la hipertensión, organismos como la OMS establecen una recomendación máxima de consumo de sal en torno a los 5g/día, equivalente a 2 gramos de sodio. Sin embargo, el consumo real se encuentra muy por encima de dicho límite. La ingesta media a nivel mundial es de 9-12 g de sal al día, variando ampliamente entre los distintos países. China y Turquía son dos países que se encuentran incluso por encima de esta media, mientras que en España el consumo es de 11g/día (Elliott 2006). Concretamente en España se estima que el 84,5% de los niños menores de 10 años tienen una ingesta superior a 4g/día, mientras que la ingesta del 66,7% de los mayores de 10 años supera los 5g/día (Aparicio et al. 2017). Estos datos indican que, a pesar de las recomendaciones, el consumo de sal supera los límites establecidos, por lo que tanto la OMS como la *American Heart Association* ponen de manifiesto la importancia de destacar que el mayor aporte dietario de sal proviene de los alimentos procesados, con el fin de reducir el consumo de estos productos y, con ello, la ingesta total de sal.

El **sodio** presente en la sal es el responsable de los problemas de salud asociados al consumo excesivo. A pesar de que se trata de un elemento presente de forma natural en el organismo, participando en funciones como la contracción muscular o el impulso nervioso, sus niveles plasmáticos se encuentran estrechamente regulados, en torno a 135-145 mEq/L. Aumentos por encima de estos valores (hipernatremia) se relacionan con retención de líquidos (edema), aumento de la presión arterial o irritabilidad. Niveles superiores a los 158 mEq/L pueden desencadenar convulsiones o coma, mientras que niveles por encima de 180 mEq/L se relacionan con una alta tasa de mortalidad. Por otro lado, el descenso en los niveles de sodio (hiponatremia) puede generar síntomas como debilidad, calambres musculares, confusión o irritabilidad. Es por esto por lo que el control de los niveles dietarios de sodio está cobrando relevancia en los países desarrollados, siendo la eliminación de la ingesta de sodio la recomendación más extendida. Sin embargo, cada vez son más numerosos los estudios que señalan que la eliminación total del sodio de la dieta no es una medida inocua, por lo que lo ideal sería mantener un consumo moderado, dentro de los límites recomendados (Graudal et al. 2014).

A pesar de que los efectos de una dieta alta en sal se relacionan generalmente con la hipertensión, recientemente se ha descrito cómo la ingesta excesiva de sodio puede provocar cambios a nivel cerebral, como deterioro cognitivo, no mediados por un aumento de la presión arterial. Concretamente, y siendo una muestra más de la existencia de un eje intestino-cerebro, se ha propuesto que la dieta alta en sodio es capaz de iniciar una respuesta inmune a nivel intestinal, medida por la interleuquina 17 (IL-17), lo que provocaría en el endotelio de los vasos

cerebrales una reducción de la liberación de óxido nítrico (NO) y la subsiguiente vasoconstricción, con la consecuente reducción de FSC que llevaría, finalmente, a la aparición de un déficit cognitivo (**Figura 6**) (Faraco et al., 2018). No obstante, los mecanismos a nivel cerebral que subyacen a este deterioro cognitivo aún se encuentran inexplorados, por lo que el estudio de los efectos de una dieta alta en sodio es un campo de especial interés.

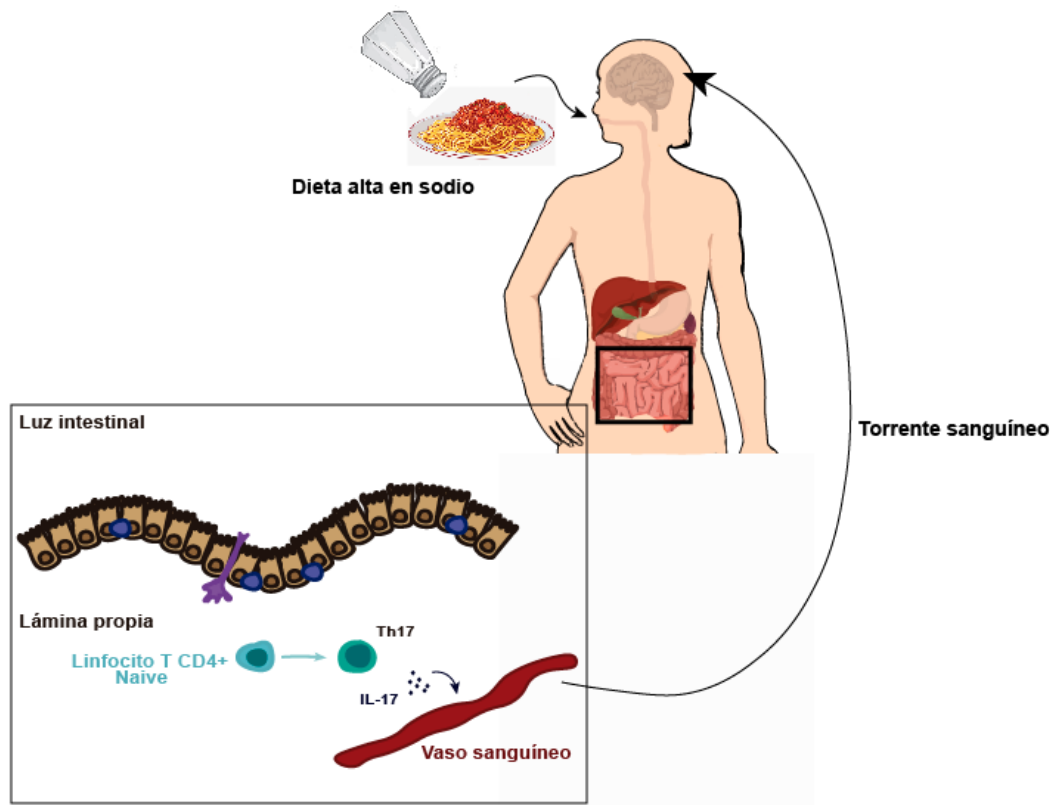


Figura 6. Esquema de los efectos propuestos de una dieta alta en sodio a través del *eje intestino-cerebro*.

1.5. El hipocampo adulto

1.5.1. Localización anatómica y vascularización

Independientemente del mecanismo por el que se produzca un descenso del flujo sanguíneo cerebral, una de las regiones más susceptibles a la hipoperfusión es el hipocampo (Venkat et al. 2015), estructura que juega un relevante papel en los procesos de memoria y aprendizaje siendo, por tanto, una de las estructuras clave en el deterioro cognitivo vascular.

El hipocampo se encuentra situado en el lóbulo temporal y su nombre, acuñado por primera vez por Arantius en 1587, deriva del término griego “caballito de mar”, debido a que su forma recuerda a la de dicho animal.

La vasculatura que nutre al hipocampo se encuentra condicionada por su localización subcortical. Al contrario que otros órganos, el cerebro sigue un patrón de vascularización "de fuera a dentro" que sitúa arterias clave para la regulación del flujo sanguíneo intracerebral fuera

del parénquima cerebral (Iadecola 2013). Esto provoca que la irrigación de las estructuras subcorticales, como el hipocampo, dependa de arteriolas penetrantes. Estas arteriolas derivan de las principales y deben atravesar el parénquima hasta llegar a las estructuras subcorticales, por lo que la reducción de su flujo no puede ser compensada por medio de colaterales, siendo por tanto más susceptibles ante fenómenos de hipoperfusión (Blinder et al. 2013).

En el ratón, el hipocampo cuenta con una irrigación procedente de las arterias carótidas internas, así como una irrigación procedente de las arterias vertebrales, ambas confluyentes en el polígono de Willis (**Figura 7**). La **arteria carótida interna** se sitúa en la zona ventral del cerebro, en la región temporo-parietal. Esta da lugar a cuatro arterias principales: la arteria comunicante posterior (AComP), la arteria cerebral media (ACM), la arteria cerebral anterior (ACA) y la arteria coroidea anterior. Esta última, situada dorsalmente, se divide en arterias más pequeñas que se dirigen a regiones más mediales, dando lugar a las arterias talámicas dorsolaterales, que nutren principalmente el tálamo. Otras ramas, en lugar de hacia la zona medial, continúan el recorrido dorsal de la arteria coroidea hacia el ventrículo lateral y sus ramificaciones irrigan el hipocampo anterior (Dorr et al. 2007) (**Figura 8**).

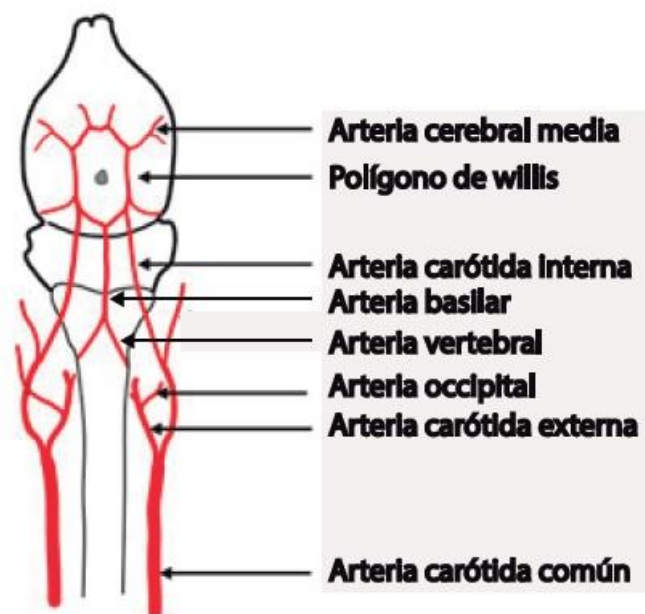


Figura 7. Representación esquemática del polígono de Willis en ratón. (Adaptado de Engel et al., 2011)

Las **arterias vertebrales** se sitúan al nivel de la médula, a la altura de la unión ponto-medular. Sus ramificaciones dan lugar, entre otras, a la arteria basilar, de la que surge a su vez la arteria cerebelar superior. Esta última se ramifica originando la arteria cerebral posterior, que finalmente da lugar a la arteria hipocampal longitudinal. Esta arteria se dirige dorsalmente siguiendo la dirección del hipocampo y da lugar a numerosas ramificaciones pequeñas, conocidas como arterias hipocampales transversas, que nacen en sentido perpendicular a la arteria madre y se infiltran en el hipocampo (Dorr et al. 2007) (**Figura 9**).

Este patrón de vascularización hace que el hipocampo sea una estructura muy sensible a la hipoperfusión, a la vez que pone de manifiesto que variaciones anatómicas vasculares entre individuos pueden condicionar el grado de afectación desarrollado, haciendo que la misma patología pueda tener manifestaciones diversas en función del individuo.

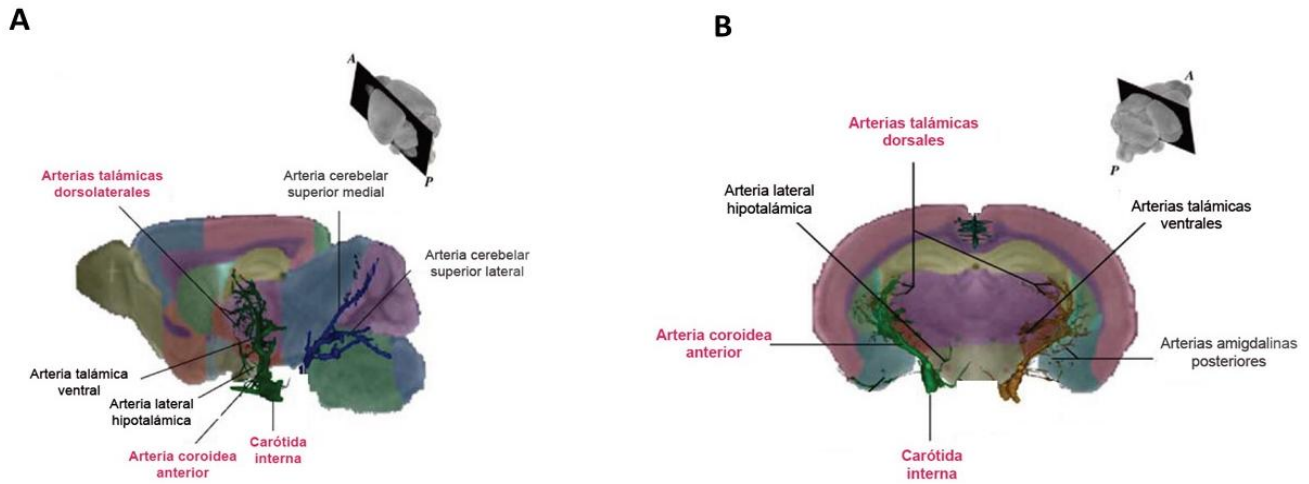


Figura 8. Vasculatura del hipocampo procedente de las arterias carótidas comunes. (A) Vista sagital (B) Vista coronal. (Adaptado de Dorr et al.,2007).

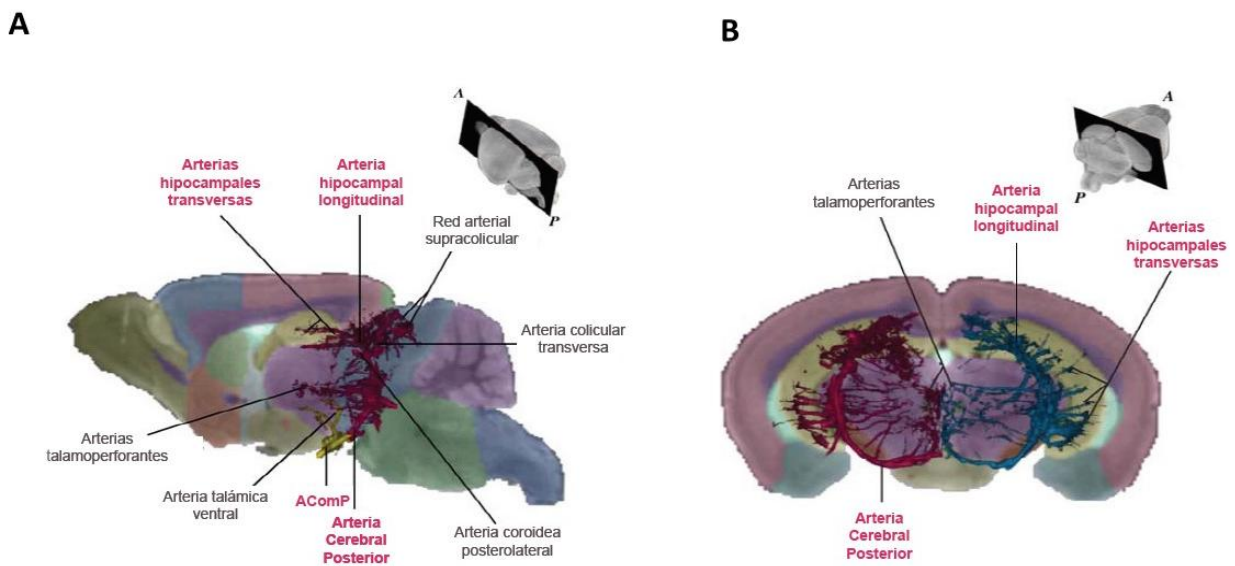


Figura 9. Vasculatura del hipocampo procedente de las arterias vertebrales. (A) Vista sagital (B) Vista coronal. (Adaptado de Dorr et al.,2007). AComP: Arteria comunicante posterior.

1.5.2. Estructura

A pesar de que ciertas discusiones terminológicas han complicado su descripción anatómica, actualmente se acepta que el hipocampo está diferenciado en dos regiones: el giro dentado (GD) y el *cornu ammonis* (CA), el cual a su vez se subdivide principalmente en CA3, CA2 y CA1. Estas dos regiones se enrollan una dentro de la otra formando en conjunto la denominada **formación hipocampal** (Tatu and Vuillier 2014).

El **giro dentado** se encuentra estructurado en tres capas celulares (**Figura 10**). La más importante, denominada **capa granular (CG)**, la ocupan los somas de las células granulares. En la base de esta capa se encuentra el nicho neurogénico hipocampal, que se presentará más adelante, formando la denominada **zona subgranular (ZSG)**. Las células granulares extienden sus dendritas apicalmente formando la **capa molecular (CM)**, la más externa y con menor densidad celular, constituida por dichas dendritas y por los axones procedentes de la corteza entorrinal (CE). Finalmente, por debajo de la capa granular se encuentra el **hilus**, también denominado capa de células polimórficas.

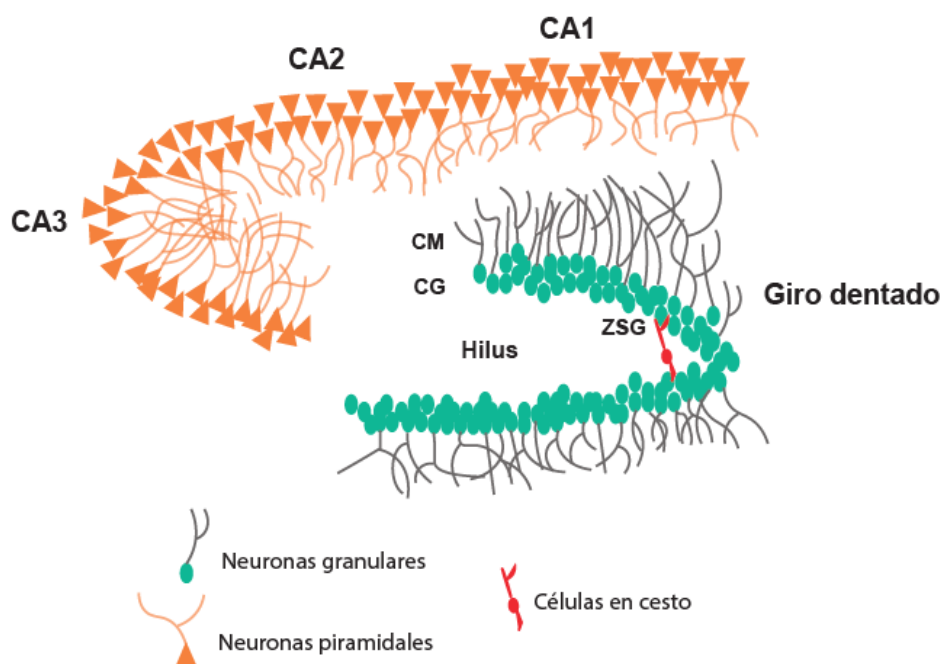


Figura 10. Estructura de la formación hipocampal. CM: Capa molecular; CG: Capa granular; ZSG: Zona subgranular; CA: *Cornu ammonis*.

Las principales células del giro dentado son las **neuronas granulares**. Se trata de células excitatorias, cuyo neurotransmisor es el glutamato, con un soma redondeado o elíptico y un amplio árbol dendrítico en forma de cono que proyecta hacia la capa molecular. Alteraciones en la morfología de este árbol dendrítico se han visto implicadas en déficits cognitivos asociados a patologías como la enfermedad de Alzheimer o la demencia post-ictus

(Cuartero et al. 2019, Llorens-Martin et al. 2013). Además de las neuronas granulares, aunque en menor proporción, en el giro dentado también se encuentran otros dos tipos neuronales. Por un lado, se encuentran las **células musgosas**, situadas en la región del hilus. Se trata de neuronas de proyección, también excitatorias, implicadas en la conexión hipocampal interhemisférica. Por otro lado, también se han descrito las **células piramidales en cesto**, localizadas en la región más profunda de la capa granular conformando un grupo de interneuronas GABAérgicas cuyos axones rodean los somas y axones de las células granulares, modulando así la transmisión sináptica.

El **cornu ammonis** (CA) se caracteriza por presentar una capa principal de neuronas que se distribuye a lo largo de una trayectoria en forma de C en la cual se distinguen las tres regiones denominadas CA1, CA2 y CA3 (**Figura 10**). Estas neuronas son **células piramidales**, glutamatérgicas, con un árbol dendrítico altamente ramificado. La longitud de este árbol posee una alta variabilidad en las células de CA2 y CA3, en función de su localización en la trayectoria en forma de C, mientras que para las células de CA1 esta longitud es más homogénea y reducida.

1.5.3. Circuito hipocampal

Las distintas regiones que conforman la formación hipocampal se encuentran conectadas, no solamente entre sí, sino también con otras regiones cerebrales como la corteza entorrinal. Estas conexiones forman lo que se conoce como los **circuitos hipocampales**, encargados del procesamiento de información en tareas de memoria y aprendizaje (**Figura 11**).

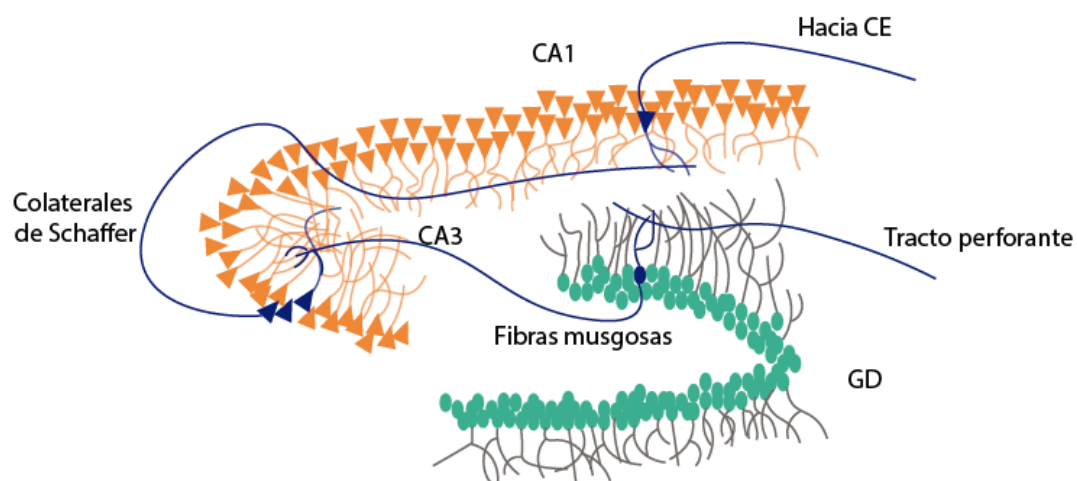


Figura 11. Principales conexiones de los circuitos hipocampales. CE: Corteza entorrinal; GD: Giro dentado.

La mayor parte de fibras aferentes que recibe el hipocampo proviene de la **corteza entorrinal (CE)**. La CE recibe aferencias de otras áreas corticales como la corteza parietal posterior, la corteza retrosplenial, la corteza prefrontal dorsolateral o la parte dorsal del surco temporal superior, estructuras estrechamente asociadas en la codificación de la localización espacial de los estímulos (Witter et al. 2000). Las capas II y III de la CE proyectan sus axones hacia la capa molecular del GD a través del **tracto perforante (TP)**, siendo así la puerta de entrada de toda la información procedente de la corteza hacia el hipocampo. A continuación, las células granulares del GD envían sus axones hacia las células piramidales de CA3 atravesando el hilus, lo que se conoce como vía de las **fibras musgosas**. Un detalle a tener en cuenta es que se calcula que cada célula granular es capaz de establecer sinapsis con hasta 15 neuronas de la región CA3. Desde CA3 los axones de las células piramidales, conocidos como **colaterales de Schaffer**, envían aferencias hacia CA1. La alta ramificación de los axones de las neuronas de CA3 hace que puedan establecer varias sinapsis a la vez con células piramidales de la región CA1. Finalmente, el circuito se completa con dos proyecciones desde CA1, una minoritaria al *subiculum* y una principal de vuelta a la CE.

1.5.4. Neurogénesis hipocampal adulta

1.5.4.1. Neurogénesis adulta, una historia de controversia

Durante buena parte de la historia de la neurociencia, el dogma de la comunidad científica mantenía que la capacidad de regeneración del sistema nervioso central de los mamíferos se perdía tras el nacimiento. Esto suponía que, una vez finalizado el desarrollo embrionario no era posible el nacimiento de nuevas neuronas, proceso conocido como **neurogénesis**.

Anatomistas como el italiano *Giulio Bizzozero* consideraban que el sistema nervioso central estaba formado por células que duraban toda la vida, carentes de capacidad replicativa (Bizzozero 1893). El Dr. Santiago Ramón y Cajal afirmaba que "una vez se completa el desarrollo, las fuentes de crecimiento y regeneración de axones y dendritas se secan irremediablemente. En el adulto, las conexiones nerviosas son algo fijo, establecido e inmutable. Todo puede morir y nada puede ser regenerado. Es trabajo de la ciencia del futuro el cambiar, si es posible, este duro decreto" (Ramon y Cajal 1913-1914). Se consideraba que la neurogénesis ocurría de manera masiva durante el periodo embrionario y se mantenía solamente durante un corto periodo de tiempo tras el nacimiento, fundamentalmente en el cerebelo. Esto reforzaba la creencia de que la extrema especialización de las funciones cerebrales era incompatible con la generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto (Colucci-D'Amato et al. 2006).

No fue hasta la década de 1960 que los estudios de *Joseph Altman* mostraron evidencias de la existencia de células en el giro dentado de ratas adultas capaces de incorporar timidina tritiada, tanto en respuesta a daño como en animales sanos. Este descubrimiento significaba la identificación de células con capacidad mitótica, capaces de incorporar timidina en su ADN, en una región del giro dentado que posteriormente se conocería como zona subgranular (Altman 1962). Sin embargo, mediante esta técnica no pudo demostrar que estas nuevas células fueran, en efecto, neuronas. Para ello, *Michael Kaplan* reprodujo los experimentos de *Altman* utilizando la técnica de microscopía electrónica para la identificación celular. Estos estudios permitieron comprobar que las células encontradas tanto en el giro dentado como en el bulbo olfatorio eran efectivamente neuronas, ya que contaban con axones, dendritas y sinapsis (Kaplan and Hinds 1977).

Sin embargo, a pesar de estas evidencias, el concepto de la neurogénesis adulta no fue aceptado por la comunidad científica. De hecho, los datos de *Kaplan* fueron marginados y desprestigiados durante varios años. A pesar de que cada vez eran más los datos que mostraban células mitóticas en el giro dentado en diferentes especies animales, el dogma seguía considerando que los neuroblastos eran células post-mitóticas (Kaplan and Bell 1984).

La controversia se mantuvo durante los años siguientes, en los que la introducción de nuevas técnicas y marcadores como la bromodesoxiuridina (BrdU) permitieron nuevas aproximaciones a la hipótesis de la neurogénesis adulta. Finalmente, el punto de inflexión lo supuso la identificación de nuevas neuronas en humanos a los que se les había administrado BrdU para el diagnóstico de cáncer (Eriksson et al. 1998), junto con el aislamiento de células madre con capacidad neurogénica de hipocampos humanos adultos (Palmer et al. 2001).

Aunque a partir de entonces el interés en la neurogénesis adulta ha crecido exponencialmente, el debate aún no ha terminado. Actualmente, la existencia de la neurogénesis más allá del periodo embrionario en roedores se encuentra ampliamente aceptada; sin embargo, la discusión ahora parece centrarse en si esto mismo ocurre también en los seres humanos. Dos trabajos de muy reciente publicación han reabierto el debate al mostrar resultados opuestos. Por un lado, Sorrells et al., (2018) concluyen que la neurogénesis en el hipocampo humano cae dramáticamente durante la infancia hasta alcanzar niveles indetectables durante la etapa adulta (Sorrells et al. 2018), mientras que el trabajo de Boldrini expone la existencia de neurogénesis a lo largo de toda la vida (Boldrini et al. 2018). Estos trabajos han suscitado la respuesta de varios investigadores de relevancia en el campo de la neurogénesis, que aluden a discrepancias metodológicas y a que la traslación directa de estudios animales a humanos resulta siempre problemática (Kempermann et al. 2018). El debate continúa actualmente, y nuevos datos parecen decantar la balanza hacia no solamente la existencia de neurogénesis en el hipocampo humano adulto, sino a que esta se encuentra disminuida en pacientes con EA o DCV (Moreno-Jimenez et al. 2019; Tobin et al. 2019).

Todo esto pone de manifiesto la necesidad de continuar la investigación, con nuevos métodos que permitan la identificación y el estudio de las nuevas neuronas y nos permitan solucionar algunas de las muchas cuestiones que aún se encuentran sin respuesta en el campo de la neurogénesis.

1.5.4.2. El nicho neurogénico hipocampal

Como se ha comentado previamente, en roedores, el nicho neurogénico del hipocampo, donde residen las **células madre neurales** (*neural stem cells*, NSCs) es la zona subgranular del giro dentado. Estas células madre van pasando por varios estadios de diferenciación hasta finalmente convertirse en neuronas maduras completamente integradas en el circuito hipocampal, proceso que se completa pasadas unas 8 semanas. (**Figura 12**).

El primer paso de la cascada neurogénica reside en las **células progenitoras tipo 1**. Estas células son pluripotenciales y se encuentran principalmente en un estado quiescente. Su soma se localiza en la SGZ y proyectan una única dendrita apical a lo largo de la capa granular. Debido a su expresión del marcador GFAP también se las conoce como **glía radial** (Bonaguidi et al. 2011). También expresan otros marcadores como nestina, BLBP (*brain lipid-binding protein*), vimentina y Sox2 (Encinas and Enikolopov 2008).

Estas células pueden dividirse asimétricamente, dando lugar a las **células progenitoras tipo 2** (**Figura 12**). A diferencia de las anteriores, estas células presentan una alta capacidad proliferativa y también se las conoce como células amplificadoras transitorias (*amplifying neural progenitors*, ANPs). Las ANPs son células redondas que han perdido la expresión de GFAP y vimentina, pero mantienen la de BLBP y, en menor medida, la de nestina (Encinas et al. 2006, Kempermann et al. 2004).

Tras varias divisiones simétricas que generan un *pool* de progenitores neurales, estas células se convierten en neuronas inmaduras o **neuroblastos**. Durante esta transición de ANP a neuroblasto, gran parte de los progenitores entran en apoptosis y son fagocitados por la microglía, de forma que solamente un tercio de las nuevas neuronas generadas alcanza el estado de neuroblasto (Sierra et al. 2010). Estas células expresan marcadores como doblecortina (DCX), o la molécula de adhesión neural PSA-NCAM.

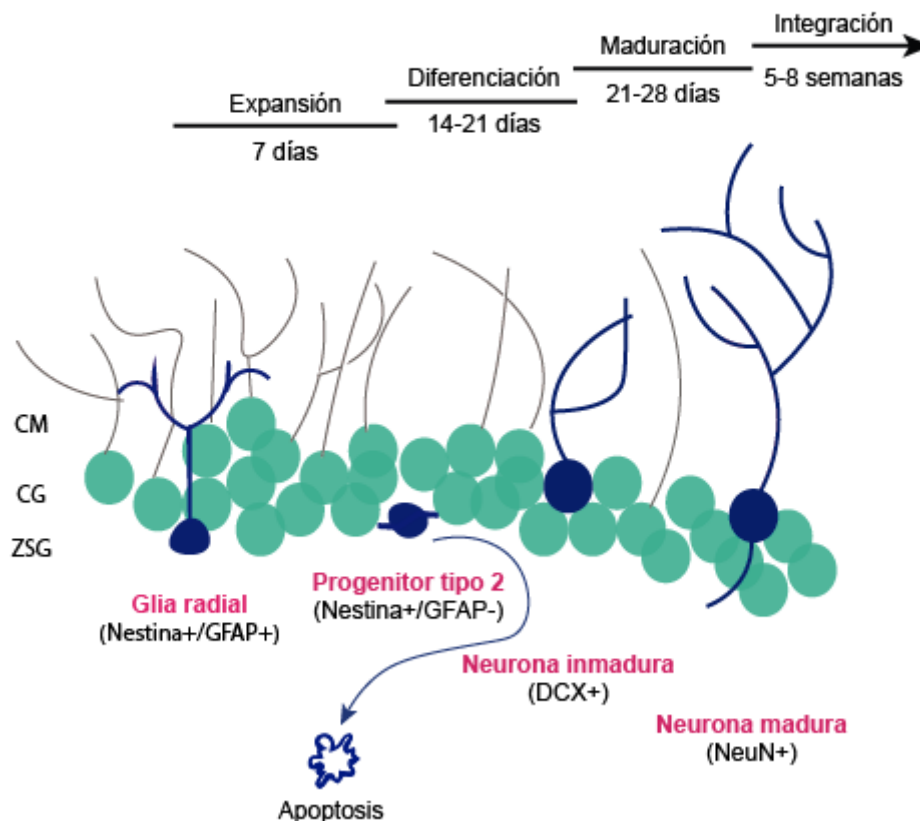


Figura 12. Perfil temporal de la neurogénesis hipocampal adulta. GFAP: Proteína ácida fibrilar de la glía (marcador de células madre neurales y astrocitos); DCX: Doblecortina (marcador de nuevas neuronas inmaduras) NeuN: Núcleo neuronal (marcador de neuronas maduras funcionales).

Los neuroblastos irán ingresando progresivamente en la capa granular y adquiriendo características de **neuronas maduras**, proyectando una dendrita apical hacia la capa molecular y un axón hacia CA3. Tras 14-21 días comienzan a expresar receptores glutamatérgicos NMDA, etapa en la que son altamente excitables (Esposito et al. 2005). Pasados 21-28 días comienza la generación y maduración de espinas dendríticas, así como de los terminales sinápticos de los axones, lo que permite la integración de nuevas conexiones en los circuitos hipocampales (Toni et al. 2007).

Una vez alcanzadas las 8 semanas de edad, a pesar de que las espinas dendríticas y los terminales sinápticos pueden seguir modificándose, las nuevas neuronas presentan características electrofisiológicas similares a las de las neuronas maduras y se encuentran integradas en los circuitos del hipocampo, expresando marcadores como NeuN (**Figura 12**).

1.5.5. Formación de la memoria en el hipocampo

En términos generales se considera al hipocampo como la región cerebral encargada de los procesos de **memoria y aprendizaje**. Sin embargo, su papel es diferente en cada caso y existe cierta controversia en cuanto al nivel de implicación de esta estructura en las distintas etapas de establecimiento de la memoria.

Adquirir o modificar una representación interna como resultado de una experiencia se considera **aprendizaje**. La retención de esta representación a lo largo del tiempo es lo que se conoce como **memoria** (Dudai 2004). En el proceso de memoria pueden diferenciarse varias fases: la codificación, el almacenamiento o consolidación y el recuerdo o recuperación. Es en estas distintas fases en las que el papel del hipocampo varía según la literatura, no existiendo un consenso en lo que a los sustratos neuroanatómicos requeridos en cada una de ellas se refiere.

El proceso de **codificación** es uno de los más estudiados y en el que la implicación del hipocampo parece más claramente aceptada cuando se trata de memoria espacial o de memoria episódica, en la que el componente espacial juega un papel fundamental (Dere 2008). En esta primera fase, la información que llega al giro dentado, proveniente de la corteza entorrinal, es transferida a CA3 formando un patrón de codificación específico (**Figura 13A**). De esta forma, cuando dos estímulos similares llegan al giro dentado, este es el encargado de transferir esta información a CA3 formando dos patrones de codificación distintos, de modo que dos estímulos similares puedan ser diferenciados. Este proceso es lo que se conoce como **separación de patrones** (**Figura 13B**) (Rolls 1996). La importancia de este proceso recae en que la separación de patrones se propone como un mecanismo esencial en la codificación de la información para evitar la interferencia entre dos recuerdos. Si dos eventos son codificados en patrones muy similares, el recuerdo resultante puede converger en un mismo patrón, haciendo que posteriormente sea imposible diferenciar entre ambos eventos (Hopfield 1982, Treves and Rolls 1992). El estudio del proceso de separación de patrones se basa en su mayoría en modelos computacionales. Aunque se han propuesto varios modelos al respecto, todos parecen coincidir en proponer a las nuevas neuronas formadas en el giro dentado como las responsables de crear el patrón específico de codificación que será transferido a CA3 debido, en parte, a su mayor excitabilidad y plasticidad en comparación con las neuronas maduras, lo que pone de manifiesto la importancia de la neurogénesis hipocampal en la formación de nuevos recuerdos (Esposito et al. 2005, Ge et al. 2007). En este sentido, se propone que déficits en la neurogénesis impiden una correcta separación de patrones por parte del hipocampo, lo que dificulta la diferenciación entre dos estímulos similares (**Figura 13C**) (Deng et al. 2010).

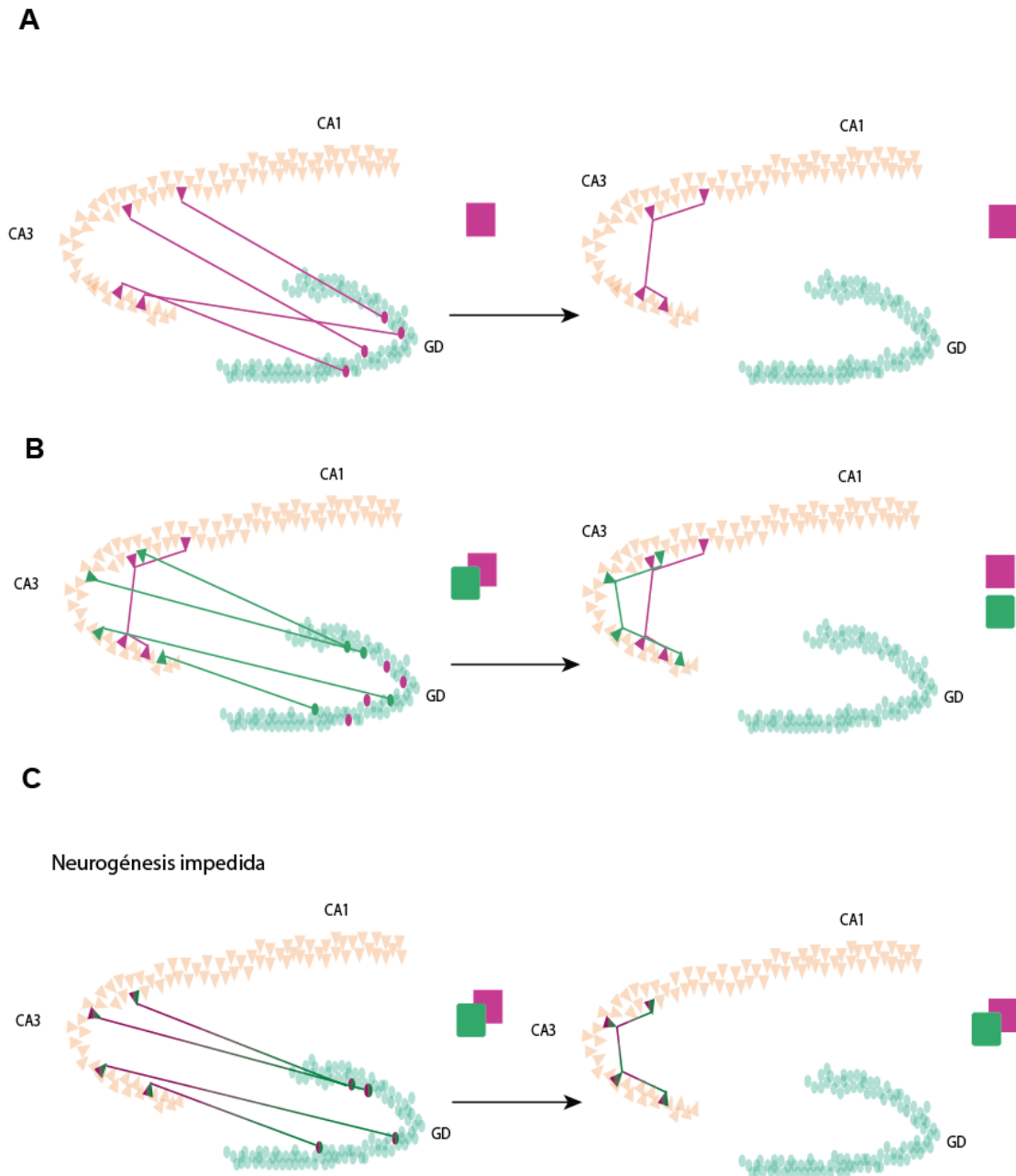


Figura 13. Representación esquemática del proceso de separación de patrones. **(A)** Codificación de un único estímulo **(B)** Codificación y separación de dos estímulos similares **(C)** Codificación incorrecta de dos estímulos similares en una situación de neurogénesis impedida. (Elaborado a partir de (Deng et al. 2010)).

Durante la **consolidación** del recuerdo, este pasa a una forma más estable, capaz de perdurar en el tiempo. De esta forma las representaciones, inicialmente dependientes del hipocampo, son reorganizadas y transferidas paralelamente a diversas regiones de la corteza (Squire et al. 2015). Sin embargo, esto no implica que el recuerdo pase a ser independiente del hipocampo, existiendo diversas teorías al respecto.

La fase de **recuerdo** es quizás la menos estudiada de las tres, por lo que la información referente a las áreas cerebrales implicadas en la reactivación de una memoria es escasa y también contradictoria. A este respecto parece importante tener en cuenta el tipo de memoria al que se quiere acceder. En la memoria asociada al miedo, posiblemente la más utilizada en estudios con animales, varios autores apuntan a que permanece dependiente del hipocampo, siendo la región CA1 clave en el proceso de recuerdo (Matus-Amat et al. 2004, Ocampo et al. 2017), mientras que otros autores sugieren la implicación de otras estructuras como la amígdala o el núcleo paraventricular talámico, además del propio giro dentado (Bernier et al. 2017, Do-Monte et al. 2015, Do Monte et al. 2016).

No obstante, es necesario señalar que casi toda la información sobre la formación de la memoria proviene de modelos computacionales, así como de conclusiones obtenidas a partir de modelos animales en los que se dañan específicamente diferentes regiones cerebrales, por lo que la aparente controversia puede resultar, en parte, de la utilización de diferentes aproximaciones metodológicas. Actualmente, la mejora de la resolución en técnicas de neuroimagen así como la posibilidad de obtener registros electrofisiológicos en pacientes de neurocirugía permiten obtener datos que distinguen las diferentes regiones del hipocampo humano, lo que ayudará a comprender la formación de recuerdos en el cerebro humano y sus similitudes y diferencias con lo descrito hasta ahora en roedores (Ben-Yakov et al. 2015, Clark and Squire 2013).

1.6. Neuroinflamación y respuesta inmune periférica

El término neuroinflamación hace referencia a la activación de las células inmunes del SNC (microglía, astrocitos, células endoteliales y células inmunes periféricas) que conduce a la liberación de factores proinflamatorios tales como citoquinas, quimioquinas y especies reactivas. Este proceso se produce por diferentes causas dependientes del contexto y de las características y duración del estímulo primario, y se ha visto implicado en la patología de varias enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica o la demencia frontotemporal (Cagnin et al. 2004, Gerhard et al. 2006, Kinney et al. 2018, Turner et al. 2004).

1.6.1. Microglía

A pesar de que el cerebro se considera un órgano inmunoprivilegiado debido a que las células del sistema inmune periférico no pueden atravesar la barrera hematoencefálica, cada vez más datos apoyan la existencia de una interacción entre microglía y astrocitos y la respuesta inmune periférica (Lim et al. 2015, Qin et al. 2007).

Las células de **microglía** son los macrófagos residentes en el cerebro. Fueron originalmente descritas por el Dr. Pío del Río-Hortega, quien propuso que la microglía es un tipo de célula de origen mesodérmico con morfología ameboide, que alcanza el cerebro en

estadios tempranos del desarrollo empleando como guía los vasos sanguíneos y los tractos de materia blanca. Una vez en el cerebro, la microglía se establece de forma uniforme ocupando, cada unidad, un territorio definido y estableciéndose con una morfología ramificada característica en el adulto. Tras un estímulo patológico estas células se transforman, adquiriendo una morfología ameboide similar a la encontrada durante el desarrollo, que les permite migrar, proliferar y fagocitar (Rio-Hortega 1932).

Salvo por algunos matices, esta descripción es perfectamente válida hoy en día. La morfología ramificada descrita por Río-Hortega en el cerebro adulto es lo que se conoce como “microglía en reposo” y es la que se puede encontrar en un cerebro adulto sano. Contrariamente a lo que su nombre sugiere, no se trata de células inactivas, sino que sus ramificaciones les permiten rastrear constantemente el espacio extracelular y participar activamente en la regulación del microambiente cerebral (Yang et al. 2010). Además, se ha descrito que esta microglía ramificada es capaz de fagocitar espinas dendríticas y neuronas apoptóticas en condiciones fisiológicas, tanto durante el desarrollo como en el cerebro adulto (Dalmau et al. 2003, Schafer et al. 2012, Sierra et al. 2010).

Debido a su constante vigilancia del medio extracelular, se considera que la microglía es la primera en responder ante estímulos inflamatorios. En estas condiciones, las células microgliales cambian su forma hacia una más ameboide, en la que la longitud de sus ramificaciones se reduce (**Figura 14**). En este estado, la microglía puede desplazarse siguiendo gradientes quimiotácticos y aumentar su proliferación. La activación también supone cambios a nivel de expresión génica, con modificaciones en la expresión de moléculas de superficie así como con la liberación de moléculas de carácter pro-inflamatorio, como TNF- α , IL-6 o especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (EROs/ERNs) (Kettenmann et al. 2011). Esta activación microglial es una característica común a varias enfermedades neurodegenerativas en las que la respuesta inmune mediada por la microglía parece contribuir al daño neuronal y al progreso de la enfermedad (Du et al. 2017, Wolf et al. 2017). Concretamente, en pacientes dentro del espectro del deterioro cognitivo vascular se ha propuesto recientemente que la activación microglial precede a la aparición de síntomas clínicos de deterioro cognitivo, mientras que la respuesta astrocitaria parece ocurrir en estadios más tardíos de demencia (Nordengen et al. 2019). Además, en roedores, se ha descrito cómo la activación microglial en el hipocampo parece influir tanto en la supervivencia neuronal como en la propia respuesta neurogénica (Plaza-Zabala et al. 2017, Salter and Stevens 2017, Sierra et al. 2014).

Sin embargo, la activación microglial no siempre implica la liberación de moléculas pro-inflamatorias. De manera similar a lo que ocurre en los macrófagos y los neutrófilos, se ha descrito un estado de activación alternativo de la microglía, denominado M2 adoptando la nomenclatura utilizada en macrófagos, en la que esta adquiere un fenotipo neuroprotector y neuroreparador, con la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-4 o IL-10 (**Figura 14**). Al contrario de lo que sucede en la periferia, donde la polarización alternativa se ha estudiado y clasificado en diversos fenotipos M2, la polarización alternativa de la microglía aún

se encuentra poco estudiada, desconociéndose si un fallo en la respuesta M2 podría estar implicada en la respuesta inflamatoria crónica observada en las enfermedades neurodegenerativas (Cherry et al. 2014, Subramaniam and Federoff 2017, Tang and Le 2016).

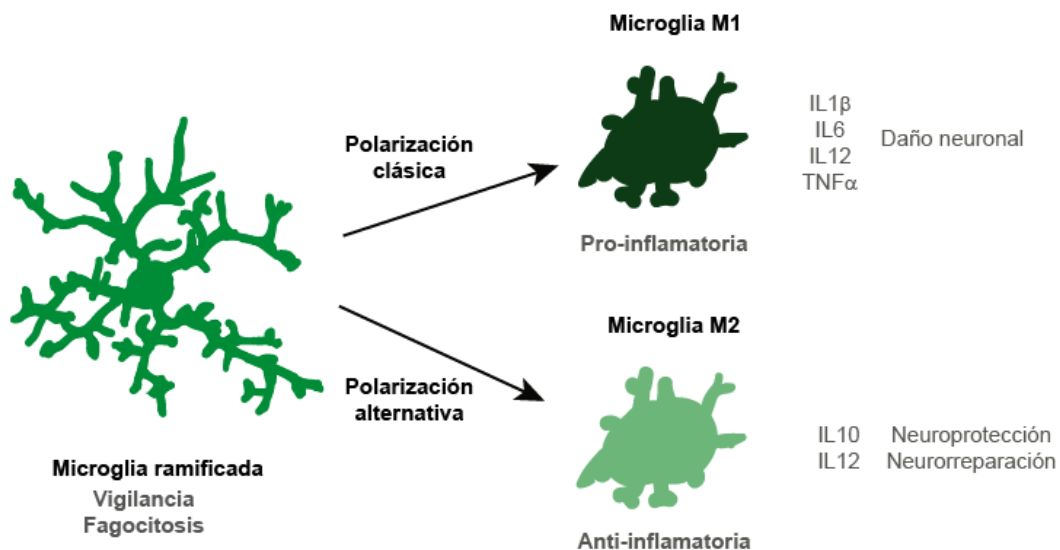


Figura 14. Diferentes estados propuestos de polarización de la microglía

1.6.2. El receptor TLR4 como director de la orquesta inflamatoria

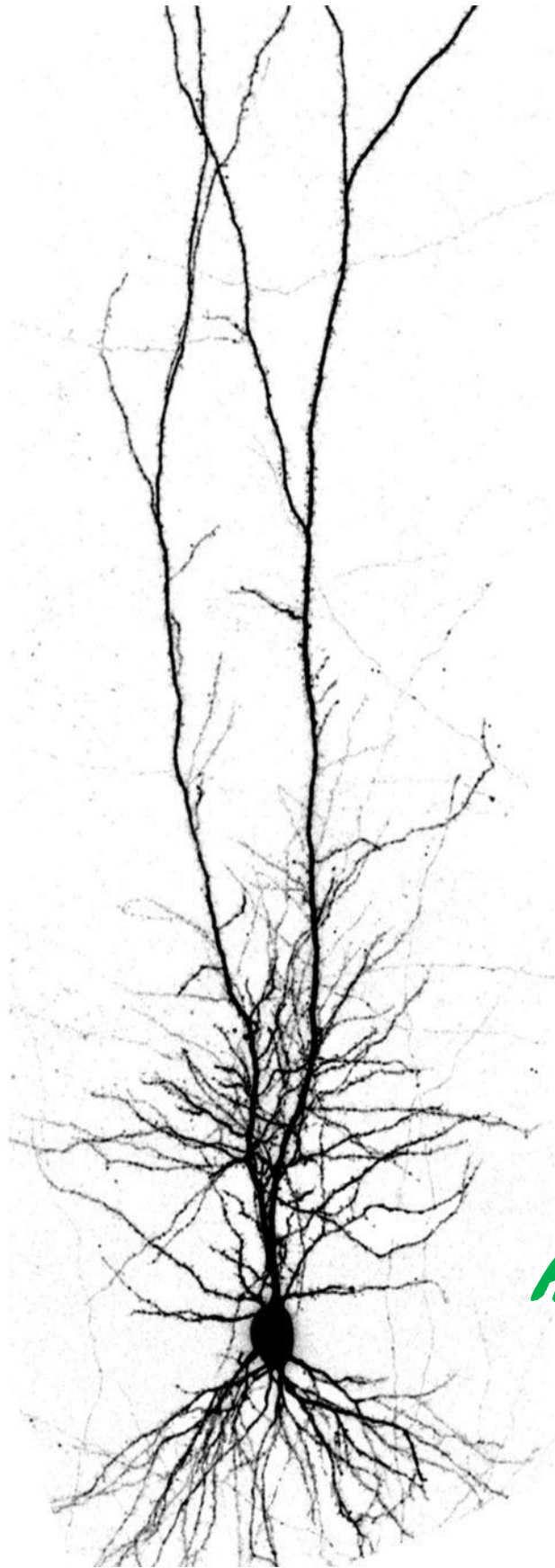
El **receptor TLR4** (*Toll-like receptor 4*) es uno de los miembros de la familia receptores *Toll-like* (TLRs), que a su vez pertenecen a la familia de los denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *Pattern Recognition Receptor*) (Takeda et al. 2003). Estos receptores son capaces de reconocer tanto patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs), presentes en virus, bacterias o parásitos, como señales endógenas asociadas a daño tisular (*damage-associated molecular patterns*; DAMPs), liberadas por las células tras un daño. Se han descrito 11 miembros funcionales de la familia TLR en humano y 12 en ratón, estando los TLR1-9 conservados en ambas especies y cada uno con una función específica en términos de reconocimiento de PAMPs, DAMPs y de la respuesta inmune inducida (Manavalan et al. 2011). En el caso del receptor TLR4, este es capaz de reconocer DAMPs como proteínas de choque térmico, fibrinógeno, fibronectina, ácido hialurónico o la proteína de alta movilidad HMGB1. En cuanto a los ligandos PAMPs de TLR4 se encuentran los lipopolisacáridos de la pared celular de las bacterias Gram- o la proteína de fusión del virus sincitial respiratorio (*respiratory syncytial virus*, RSV).

A pesar de que la expresión de TLR4 puede variar entre especies (Smirnova et al. 2000), en humano y en ratón se encuentra ampliamente expresado en células del sistema inmune innato, como monocitos, macrófagos, granulocitos, al igual que en células del sistema nervioso central (SNC) como microglía y astrocitos (Vaure and Liu 2014). Además, también se

ha descrito su expresión en células de la respuesta inmune adaptativa, como las células CD4+ (linfocitos T), relacionándose con enfermedades autoinmunes (Reynolds et al. 2012). La activación de TLR4 en las células del **sistema inmune innato** se encuentra ampliamente estudiada. Esta activación puede seguir dos rutas distintas de señalización: la ruta "dependiente de MyD88", que activa una cascada de señales intracelulares que culmina con la activación de NF- κ B y MAP quinasas, lo que provoca la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF α , y la ruta alternativa o "dependiente de TRIF", en la cual, además de NF- κ B también se produce la activación del factor regulador IRF3, lo que lleva a la producción de interferón tipo I (IFN- β) así como citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 (Kawai and Akira 2010, Takeuchi and Akira 2010). Por su parte, la activación de TLR4 en células del **sistema inmune adaptativo** parece estar implicada en la diferenciación de los linfocitos T CD4+, promoviendo su polarización hacia **linfocitos Th17**, un subtipo de linfocitos T recientemente descubierto, productor de IL-17 y cada vez más relacionado con enfermedades autoinmunes (Reynolds et al. 2012).

Otro tipo celular en el que se encuentra expresado el receptor TLR4 es precisamente la **microglía**. La activación vía TLR4 de estas células no solo tiene lugar en fenómenos agudos como la isquemia/hipoxia (Caso et al. 2007, Fernandez et al. 2018), sino que también parece tener un papel clave en enfermedades neurodegenerativas como EA (Song et al. 2011). En este contexto, la activación de la microglía vía TLR4 provoca la activación de la ruta de NF- κ B y MAP quinasas, aumentando la capacidad fagocítica, la liberación de citoquinas así como la expresión de moléculas co-estimuladoras necesarias para la respuesta inmune adaptativa (Hanke and Kielian 2011). No obstante, se ha propuesto que los efectos de la activación de TLR4 en EA pueden ser tanto beneficiosos como deletéreos. Por un lado, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias parece contribuir a la pérdida neuronal, siendo HMGB1 y A β los principales candidatos a DAMPs capaces de activar el TLR4 microglial (Scaffidi et al. 2002, Takata et al. 2003, Walter et al. 2007). Sin embargo, por otro lado, el aumento de la capacidad fagocítica de la microglía mediado por TLR4 parece contribuir a la limpieza de A β , asociándose de este modo con un papel neuroprotector (Michaud et al. 2013, Tahara et al. 2006).

Dado el importante papel que la inflamación juega en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, y puesto que el receptor TLR4 es uno de los principales desencadenantes de la respuesta inmune, el estudio tanto de la neuroinflamación como del papel de TLR4 en el contexto de la hipoperfusión crónica es uno de los objetivos de la presente tesis doctoral.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

El hipocampo es una estructura clave en los procesos de memoria, por lo que alteraciones en procesos fisiológicos como la neurogénesis o la respuesta inflamatoria, pueden ser responsables, al menos en parte, del DCV. Además, por su implicación en ambos procesos, el receptor TLR4 podría participar en el desarrollo del DCV.

2.2. Objetivos

Los objetivos planteados para demostrar la hipótesis fueron los siguientes:

1. Establecer un modelo enfermedad cerebrovascular con alteraciones cognitivas mediante estenosis de las arterias carótidas.

1.1. Caracterizar los déficits cognitivos asociados al modelo BCCAs

- 1.1.1. Alteraciones de la memoria dependiente de hipocampo en el modelo BCCAs.
- 1.1.2. Alteraciones motoras en el modelo BCCAs
- 1.1.3. Comportamientos de ansiedad y depresión en el modelo BCCAs

1.2. Estudiar mecanismos implicados en el deterioro cognitivo en el modelo BCCAs como posibles dianas terapéuticas

- 1.2.1. Evaluar el daño isquémico y alteraciones anatómicas hipocampales
- 1.2.2. Evaluar la integridad de la sustancia blanca en el modelo BCCAs
- 1.2.3. Caracterizar la neurogénesis hipocampal en el modelo BCCAs
- 1.2.4. Alteraciones neuroinflamatorias: respuesta microglial en el hipocampo.
- 1.2.5. Alteraciones vasculares: Vascularización, barrera hematoencefálica, e infiltración de células sanguíneas
- 1.2.6. Estudiar marcadores periféricos: NETosis en plasma.

2. Establecer un modelo enfermedad cerebrovascular con alteraciones cognitivas a partir de una dieta alta en sodio (*high sodium diet, HSD*).

2.1. Caracterizar el déficit cognitivo en el modelo HSD

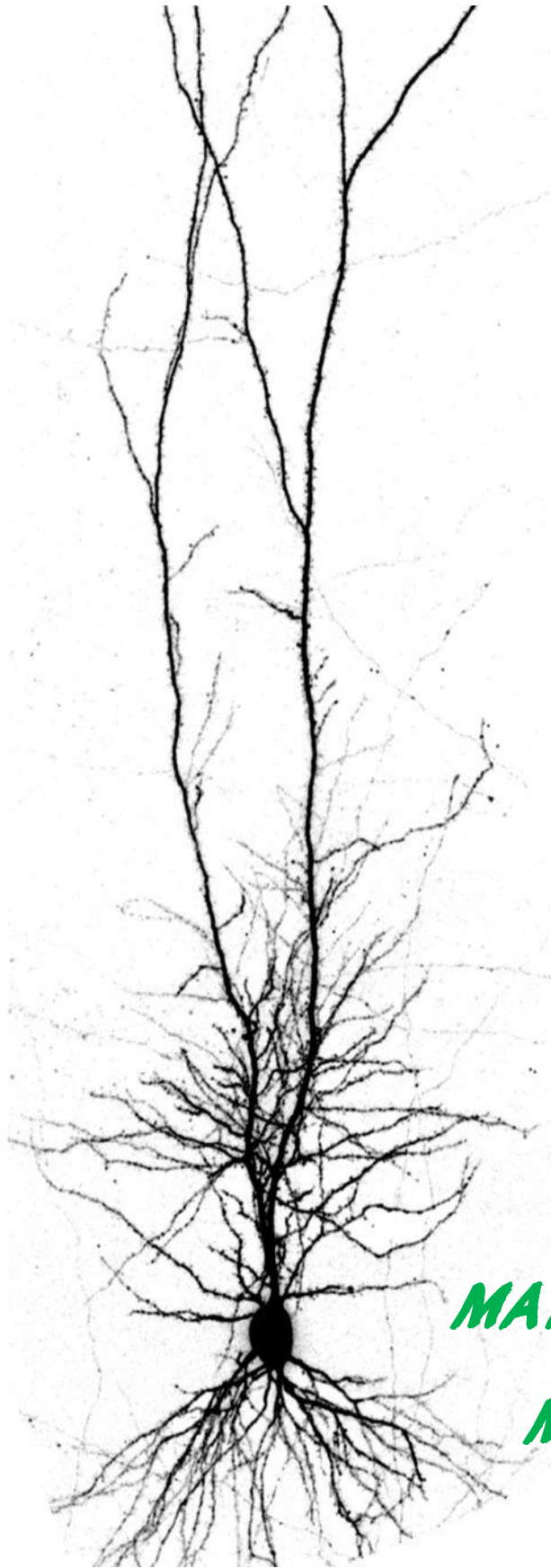
- 2.1.1. Alteraciones de la memoria dependiente de hipocampo en el modelo HSD

2.2. Estudiar mecanismos implicados en el deterioro cognitivo en el modelo HSD como posibles dianas terapéuticas

- 2.2.1. Evaluar el daño isquémico y alteraciones anatómicas hipocampales
- 2.2.2. Caracterizar la neurogénesis hipocampal en el modelo HSD
- 2.2.3. Alteraciones neuroinflamatorias: respuesta microglial en el hipocampo
- 2.2.4. Alteraciones vasculares: Barrera hematoencefálica, e infiltración de células sanguíneas
- 2.2.5. Marcadores periféricos: Tensión arterial y niveles plasmáticos de Na⁺
- 2.2.6. Estudiar la reversibilidad del déficit tras regreso a dieta normal

2.3. Estudiar el papel del receptor TLR4 en el modelo HSD

- 2.3.1. Evaluar el déficit cognitivo asociado al modelo HSD en ratones TLR4^{-/-}
- 2.3.2. Evaluar las alteraciones hipocampales asociadas al modelo HSD en ratones TLR4^{-/-}
- 2.3.3. Caracterizar la neurogénesis hipocampal en animales TLR4^{-/-}
- 2.3.4. Alteraciones neuroinflamatorias: respuesta microglial en el hipocampo en animales TLR4^{-/-}
- 2.3.5. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica
- 2.3.6. Evaluar alteraciones en marcadores periféricos asociado al modelo HSD en ratones TLR4^{-/-}
 - 2.3.6.1. Perfil de diferenciación de los linfocitos T hacia Th17
 - 2.3.6.2. Evaluar los niveles de citoquinas circulantes
 - 2.3.6.3. NETosis en plasma.



***MATERIALES Y
MÉTODOS***

3.1. Normativa y animales de experimentación

Todos los protocolos experimentales se rigieron bajo las guías de experimentación animal del Comité de la Universidad Complutense de Madrid (directivas de la UE 86/609/CEE, española RD 53/2013). Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura y humedad, con libre acceso a comida y agua, y un ciclo de luz/oscuridad de doce horas.

Se utilizaron ratones macho adultos C57BL/6J de 2 meses de edad (Harlan Laboratories Inc.). Además, se utilizaron ratones transgénicos B6.B10ScN-*Tlr4*^{ps-del}/JthJ, carentes del receptor TLR4 (TLR4^{-/-}) y sus correspondientes controles (Jackson Laboratories). Los animales *Tlr4*^{-/-} presentan una mutación espontánea que corresponde a una delección de 74723 pb que elimina completamente la secuencia codificante para TLR4, de forma que no hay expresión de RNAm ni de proteína.

3.2. Modelos animales

3.2.1. Modelo de estenosis bilateral de las arterias carótidas (BCCAs)

El modelo de estenosis bilateral de las arterias carótidas (BCCAs, *bilateral common carotid artery stenosis*) es un modelo de hipoperfusión cerebral originalmente descrito por Shibata y colaboradores (Shibata et al. 2004), consistente en la reducción del flujo sanguíneo cerebral mediante la implantación quirúrgica de *microcoils* de 0,18 mm de diámetro interno (DI) y 2,5 mm de longitud total (L). Estos *microcoils* se colocan alrededor de las arterias carótidas comunes, estrechando así su luz y provocando la hipoperfusión cerebral (**Figura 15**). Con esto se consigue una reducción crónica del FSC del 20%, siendo un modelo ampliamente aceptado de hipoperfusión cerebral y deterioro cognitivo vascular (para revisión de modelos de deterioro cognitivo vascular ver (Jiwa et al. 2010)).

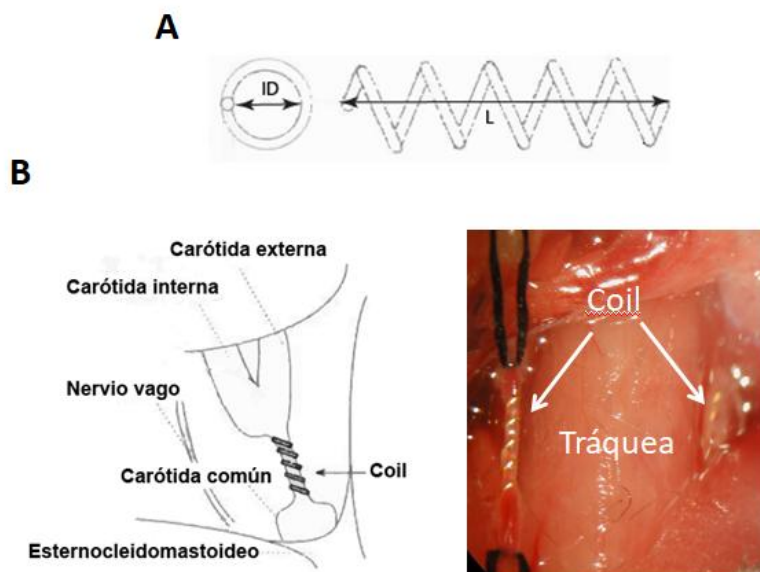


Figura 15. Esquema de la cirugía de BCCAs. **(A)** Microcoil **(B)** Colocación del microcoil en la arteria carótida **(izda)** representación esquemática **(dcha)** imagen real (Adaptado de (Shibata et al. 2004)).

Para llevar a cabo dicho procedimiento, los animales se introdujeron en una cámara de inducción de anestesia con una mezcla de oxígeno/aire (0,2/0,8 L/min) e isoflurano al 2-2,5% durante 5 minutos. Durante la cirugía, la anestesia se mantuvo al 1,5-2% de isoflurano con igual mezcla de oxígeno/aire comprimido. La temperatura corporal fue controlada con una sonda de temperatura y se mantuvo a $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ usando una manta térmica colocada bajo el animal. La colocación de los *microcoils* comienza con una incisión en la línea media cervical, seguida del aislamiento de la arteria carótida izquierda. Una vez aislada, la arteria se levanta ligeramente y se fija en esta posición mediante una seda 6/0 en posición proximal. El *microcoil* se coloca al enrollar cuidadosamente la arteria sobre este, justo antes de la bifurcación carotídea. Finalmente, la arteria se libera y se devuelve a su posición original. El animal se mantiene bajo anestesia durante un periodo de 30min tras el cual se realiza el mismo procedimiento para la colocación del *microcoil* en la arteria derecha (**Figura 15**). Los animales *sham* se sometieron tanto a la anestesia como al procedimiento quirúrgico, pero sin el empleo de *microcoils*.

3.2.2. Modelo de dieta alta en sodio (HSD)

En este modelo, los animales fueron alimentados con pienso normal (*normal diet, ND*), con un contenido en NaCl del 0,4%, (*Teklad Global Rodent Diet, Envigo*) o con una dieta rica en sodio (*high sodium diet, HSD*), con un contenido en NaCl del 4% (4% NaCl diet; TD.92034, Envigo), durante cinco semanas. Para los experimentos de reversibilidad del déficit cognitivo, tras las 5 semanas de dieta alta en sodio los animales fueron devueltos a una dieta normal durante otras 5 semanas.

3.3. Tests comportamentales

Con el fin de evaluar la función neurológica de los animales se realizó un amplio abanico de tests que cubren diferentes parámetros tanto cognitivos como motores. Todos los tests que se indican a continuación fueron grabados con una cámara de video para su posterior análisis. En todos los casos el correspondiente recinto de ensayo y, en su caso, los objetos introducidos, fueron limpiados cuidadosamente con alcohol con el fin de eliminar residuos y claves olfativas que pudieran afectar a los resultados del test tanto al inicio de la sesión como entre individuos. Para la realización de los tests se emplearon dos protocolos en función del momento en que tuvo lugar la sesión de adquisición del recuerdo. Así, consideramos un protocolo *retrógrado* cuando dicha sesión se realizó con anterioridad al inicio del tratamiento experimental (Sham/BCCAs o ND/HSD). Por el contrario, lo consideramos *anterógrado* cuando la sesión de adquisición se realizó al finalizar el correspondiente tratamiento experimental.

3.3.1. Test de campo abierto

El test de campo abierto permite evaluar el nivel de ansiedad del ratón, basándose en lo que se conoce como tigmotaxia, o la preferencia que muestran algunos animales a permanecer cerca de las paredes. Cuando un ratón es introducido en un recinto de grandes dimensiones, como el empleado en este test, tienden a explorar la zona de la periferia durante los primeros 3 minutos. Sin embargo, pasados estos minutos iniciales, la tigmotaxia decrece y el animal explora con mayor frecuencia zonas centrales del recinto, hasta un máximo de 15 minutos. La tigmotaxia durante el tiempo de mayor exploración (entre 3 y 15 min) se considera un índice de la ansiedad del animal (Simon et al. 1994). El campo abierto utilizado consistió en un recinto de plexiglás de medidas 70cm x 40cm x 40cm. Durante el ensayo, cada animal se colocó en el centro de la cámara y se le dejó actuar libremente durante 8 minutos. El comportamiento de cada ratón se analizó posteriormente utilizando el programa informático *Ethowatcher*. Se registraron la distancia total recorrida y el tiempo que el ratón permanece en el área considerada como centro, frente al tiempo en la periferia. Para ello se considera como centro una región situada dentro del recinto de ensayo, con igual forma que este, pero con dimensiones reducidas en un 40% (**Figura 16A**).

3.3.2. Test de natación forzada de Porsolt

El test de natación forzada (Porsolt et al. 2001) permite evaluar el comportamiento depresivo del ratón. Este test considera que cuando un animal es forzado a nadar en un espacio pequeño sin salida, tras un periodo inicial de actividad vigorosa, adopta una postura de inmovilidad, limitándose a los movimientos justos para mantener la cabeza a flote. Se considera que esta inmovilidad refleja que el animal ha perdido la esperanza de poder escapar, y deja de intentarlo. Un gran número de fármacos antidepresivos son capaces de reducir este tiempo de inmovilidad, por lo que este test se considera como una medida del comportamiento depresivo del ratón y es ampliamente utilizado para el *screening* de nuevos antidepresivos. Así mismo, se ha demostrado su eficacia para evaluar comportamiento depresivo tras isquemia

cerebral focal en la que el territorio infartado se corresponde con el hemisferio izquierdo (Hernandez-Jimenez et al. 2017). La piscina utilizada consistió en un cilindro de cristal de 24 cm de diámetro y 44 cm de profundidad. Ésta se llenó de agua templada (25°C) hasta los 26 cm (Figura 16B). Cada ratón fue introducido en el centro de la piscina, donde permaneció libremente durante 6 minutos. El comportamiento fue grabado en video los 6 minutos de test. Durante los últimos 5 minutos se registró para cada ratón el tiempo que permanecía completamente inmóvil dentro del agua.

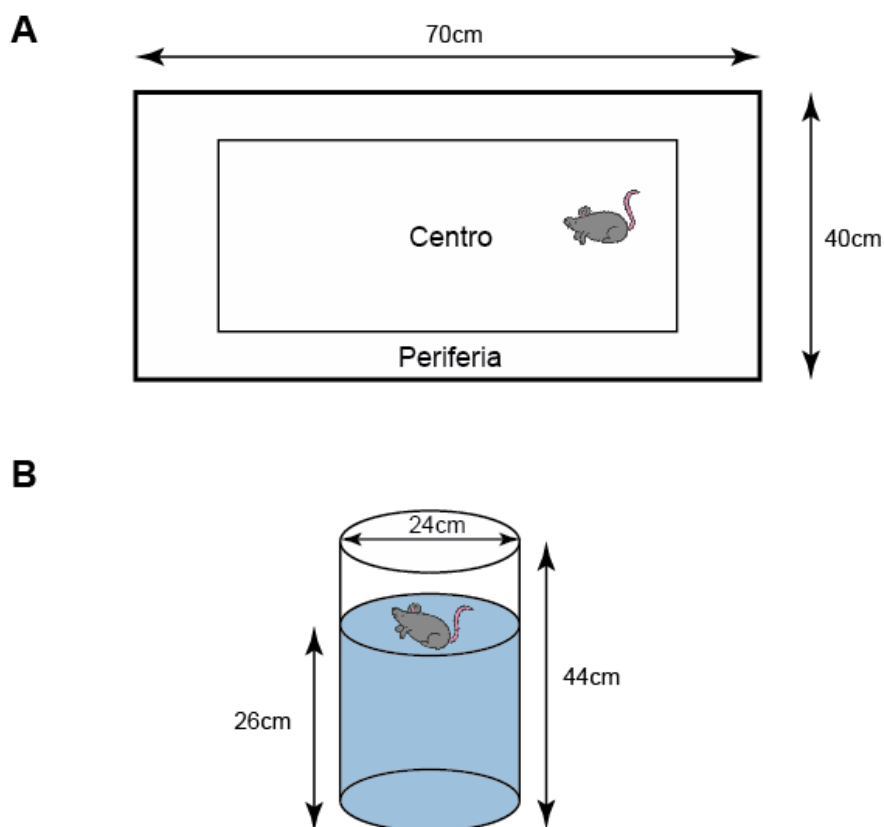


Figura 16. Esquema representativo de los tests de ansiedad y depresión utilizados. **(A)** Test de campo abierto **(B)** Test de natación forzada de Porsolt.

3.3.3. Test de la huella

El análisis de la huella del animal durante un desplazamiento normal permite evaluar la coordinación motora. Este test es un método comúnmente utilizado en roedores para la evaluación de alteraciones motoras en la enfermedad de Huntington y, más recientemente, en isquemia cerebral focal (Carter et al. 1999, Hernandez-Jimenez et al. 2017). Para la obtención de las huellas se pintaron de diferente color las patas delanteras y traseras de los ratones con pintura al temple comestible. Los animales se colocaron en un extremo de un corredor estrecho (50cm x 10cm x 10cm), cuyo suelo está recubierto con un papel absorbente. En el otro extremo se coloca una pequeña cantidad de comida con el fin de alentar al animal a caminar en línea recta sobre el papel. Del patrón de huellas obtenido se analizaron la longitud del paso para cada par de extremidades, así como la distancia entre ellas (ancho del paso) y el solapamiento de las pisadas delanteras y traseras (*overlap*) (Figura 17A).

3.3.4. Test motor de natación

En el test motor de natación, utilizado para evaluar la función motora del ratón, se mide la velocidad de nado del animal de un extremo a otro de una piscina estrecha en línea recta. El test se realizó según lo descrito previamente (Carter et al. 1999), con algunas modificaciones. Para ello se utilizó un tanque de metacrilato relleno de agua, de 30cm de alto, 100cm de largo y 8cm de ancho, que dispone, en uno de los extremos, de una plataforma de escape visible situada a 20cm de altura (**Figura 17B**). Durante el test, el animal debe nadar hasta la plataforma de escape desde el extremo opuesto, registrándose el tiempo de latencia hasta alcanzar la plataforma. Antes de realizar el test se entrena al animal a llegar a la plataforma, situándolos en un primer lugar a pocos centímetros de esta e incrementando progresivamente la distancia hasta que fueran capaces de recorrer la piscina de extremo a extremo de manera continua.

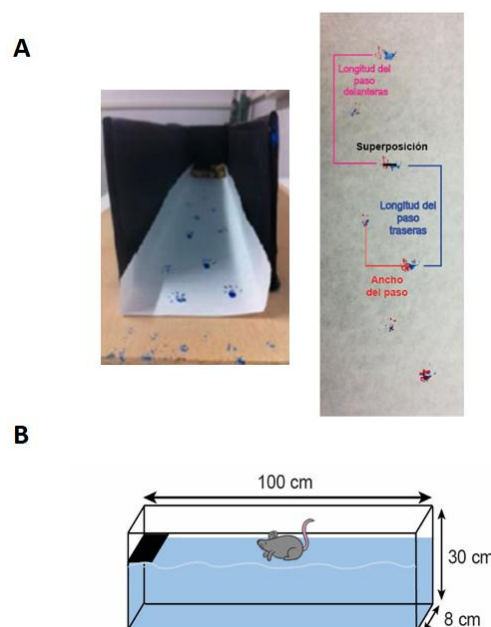


Figura 17. Representación esquemática de los tests motores utilizados **(A)** Test de la huella **(izda)** imagen real del corredor **(dcha)** patrón de huella de un animal **(B)** Test motor de natación.

3.3.5. Laberinto en Y

El laberinto en forma de Y se basa en la tendencia espontánea de los roedores de explorar nuevos ambientes y permite explorar dos paradigmas: el test de alternancia espontánea y el test del brazo cerrado (Wietrych et al. 2005). El laberinto consiste en tres brazos de 37cm x 7cm x 5cm separados 120°, formando una Y (**Figura 18A**). El entorno del laberinto dispone de claves visuales que facilitan la orientación espacial del animal. La evaluación de los dos paradigmas se realizó en tres días consecutivos.

El primer día se realizó la evaluación de la alternancia espontánea. Para ello, el ratón fue colocado en el centro del laberinto, pudiendo explorar libremente los tres brazos durante 7 minutos. Se analizó posteriormente el patrón de entradas del animal en cada uno de los brazos

(nombrados como A, B y C), considerando como alternancia tres entradas consecutivas a los tres brazos del laberinto (ABC, BCA, CAB...). El porcentaje de alternancia espontánea fue calculado como el ratio entre el número total de alternancias y el máximo posible de alternancias (número total de entradas a los brazos menos 2), multiplicado por 100. Este paradigma evalúa la memoria de trabajo espacial ya que, para mantener una alternancia entre los brazos, el animal debe llevar un registro espacial de los brazos visitados recientemente (Wietrych et al. 2005).

El paradigma del brazo cerrado se evaluó en los dos días siguientes. En la primera sesión, el ratón fue colocado en el centro del laberinto, pudiendo explorar únicamente dos de los brazos durante 7 minutos, mientras que el tercero permanecía cerrado e inaccesible. 24h más tarde, el ratón se reintrodujo en el laberinto, esta vez con todos los brazos abiertos. Durante esta sesión de evaluación se contabilizó manualmente el tiempo que el animal permaneció en cada uno de los brazos. La capacidad del animal de recordar el brazo cerrado anteriormente, junto con su tendencia a explorar ambientes nuevos, provoca que éste explore durante más tiempo el brazo cerrado (Dinel et al. 2014). El brazo cerrado (A, B o C) fue asignado de forma aleatoria para cada ratón para evitar así posibles preferencias.

En ambos paradigmas estudiados fueron excluidos del análisis aquellos animales que realizasen menos de 8 entradas en los brazos del laberinto durante todo el tiempo de evaluación.

3.3.6. Test de nueva localización de objeto (NLO)

Este test nos permite evaluar la memoria espacial, así como la separación de patrones. Para ello se utilizó una caja cuadrada de 65 cm x 65 cm x 45 cm junto con dos objetos idénticos. El test se llevó a cabo durante tres días consecutivos; los dos primeros días consistieron en la fase de habituación en la cual cada ratón fue colocado en la caja vacía durante 30 min. Al día siguiente se realizaron las fases de entrenamiento y reconocimiento. Durante la fase de entrenamiento los dos objetos idénticos se colocaron equidistantes en un extremo de la caja (**Figura 18B**) y se permitió al ratón explorar libremente durante 5 minutos, tras los cuales fue devuelto a su caja habitual. Media hora después de la fase de entrenamiento se llevó a cabo la fase de reconocimiento. En esta fase, uno de los dos objetos fue desplazado al extremo opuesto de la caja, ocupando así una nueva posición (objeto desplazado), mientras que el otro permanece en su sitio (objeto familiar). Una vez asignadas las nuevas localizaciones, se introduce al ratón de nuevo en la caja y se le deja explorar otros 5 min. El tiempo que el ratón permaneció explorando cada uno de los objetos fue contabilizado manualmente, utilizando como criterio de exploración que el animal toque, olfatee o mire directamente al objeto a menos de un centímetro de distancia del mismo. Los tiempos de exploración durante la fase de reconocimiento se utilizaron para calcular el índice de reconocimiento: tiempo de exploración del objeto desplazado entre la suma del tiempo total de exploración de ambos objetos. Este índice refleja la capacidad para discriminar entre el objeto

familiar y el desplazado. Un índice de reconocimiento por encima de 0,5 indica una exploración preferencial del objeto desplazado, lo que proporciona una medida de la memoria espacial, ya que la información espacial proporciona claves esenciales en la discriminación entre un objeto en una nueva localización y uno en una posición familiar (Murai et al. 2007, Vogel-Ciernia and Wood 2014).

3.3.7. Test de condicionamiento al miedo contextual

En el test de condicionamiento al miedo contextual (*contextual fear conditioning*, CFC) se evalúa el aprendizaje asociativo por medio del condicionamiento, existiendo diferentes variaciones y protocolos que permiten estudiar diversos paradigmas (Curzon et al. 2009). En este caso se asocia un estímulo aversivo (un shock eléctrico) con un contexto (la cámara en la que se realiza el experimento). De este modo, al volver a introducir al ratón en la misma cámara en la que recibió el electroshock, pero en ausencia de éste, observamos una respuesta de miedo que se manifiesta como parálisis total (*freezing*). El tiempo que el ratón permanece en este estado de *freezing* se considera proporcional al recuerdo que el animal guarda del contexto. El protocolo general de condicionamiento se refleja en la **Figura 18C**. El test se llevó a cabo en una cámara de condicionamiento (*Kinder Scientific*) durante dos fases: una de condicionamiento y otra de *retrieval*, siendo esta última en la que se evalúa la respuesta de *freezing*. Durante la fase de condicionamiento, el ratón se introdujo en la caja y se realizó el siguiente protocolo de condicionamiento: 150 segundos de aclimatación al contexto seguidos de 3 electroshocks de 0.6mA de 0.5 s de duración, separados 1 minuto entre sí. Un minuto tras el último electroshock, el animal fue retirado de la caja.

Durante la fase de *retrieval* se introdujo al animal de nuevo en la caja en las mismas condiciones lumínicas pero sin recibir descarga eléctrica, durante 5 minutos.

Los protocolos de CFC empleados en esta tesis doctoral permiten evaluar los recuerdos formados de manera previa al protocolo experimental, considerándose protocolos retrógrados. Para ello el condicionamiento se realizó antes del inicio del protocolo experimental correspondiente (BCCAs/Sham o ND/HSD), mientras que el *retrieval* se realizó en tiempos posteriores según el diseño experimental.

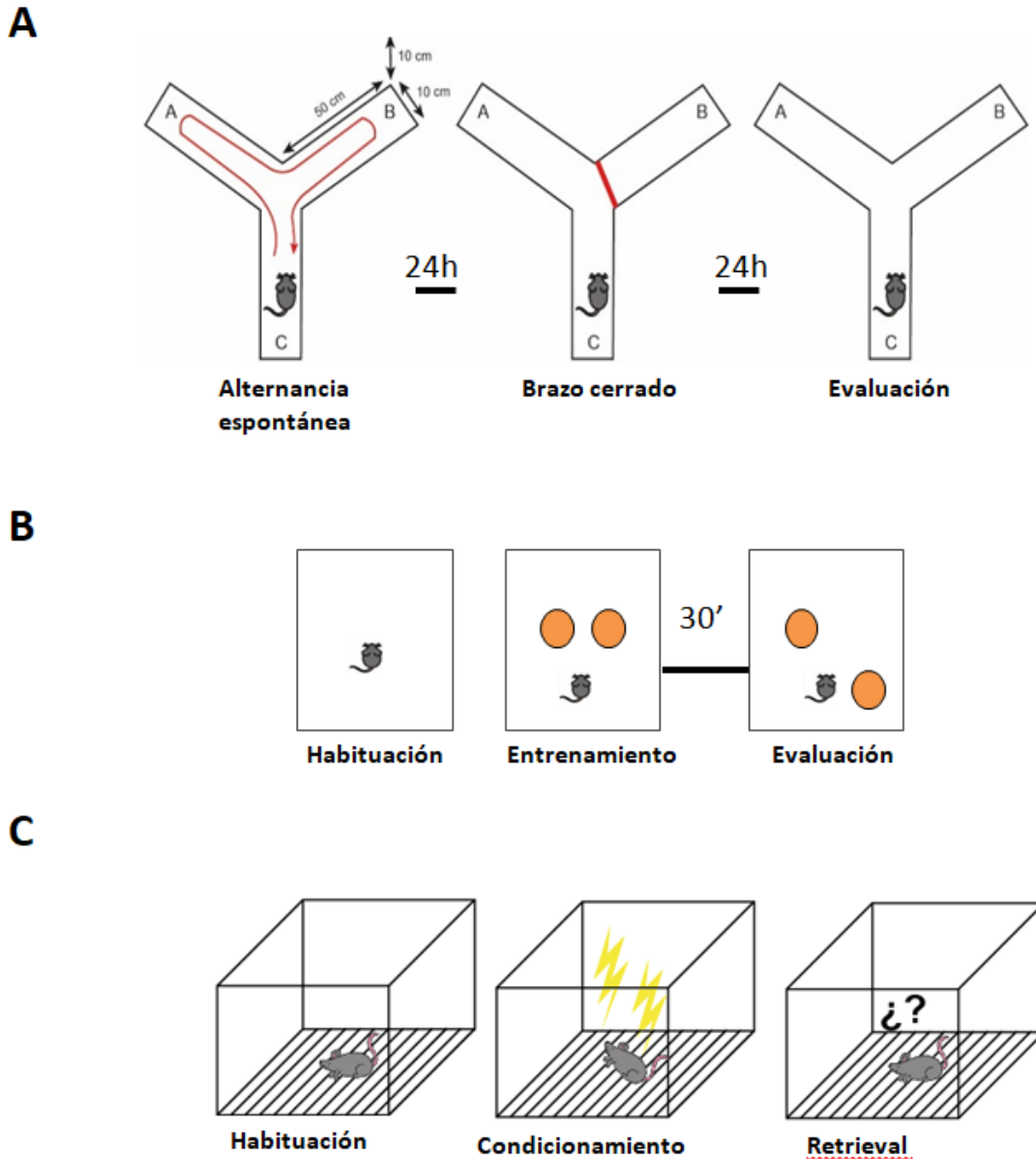


Figura 18. Representación esquemática de los tests de memoria empleados **(A)** Laberinto en Y **(B)** Test de nueva localización de objeto **(C)** Protocolo general de condicionamiento en el CFC.

3.4. Registros *in vivo*

3.4.1. Medida del flujo sanguíneo cerebral

Para la medida del flujo sanguíneo cerebral se utilizó una sonda láser-doppler transcraneal (418-1, *PeriFluxSystem 5000*, *Perimed AB*, Suecia), utilizando un adaptador-guía, que fue fijado con pegamento sobre el cráneo del animal en las coordenadas 1mm posterior y 2.5mm lateral con respecto a bregma, con ayuda de un estereotáxico, según lo descrito previamente (Shibata et al. 2004). Las medidas de FSC se realizaron a nivel basal (previo a la cirugía) así como a las 3h, 24h, 48h, 72h, 7d, 14d y 28d tras el procedimiento quirúrgico. A

cada uno de los tiempos se realizaron 3 medidas para cada animal y se representó el valor promedio.

3.4.2. Medida de la presión arterial y niveles sanguíneos de Na⁺

La medida de la presión arterial se realizó mediante canulación de la arteria femoral y se monitorizó la presión arterial durante al menos dos minutos con el sistema Lab-Trax-4/24T (*WorldPrecision Instruments*, EE.UU.).

Para la medida de los niveles sanguíneos de Na⁺ se extrajeron 50µL de sangre cardíaca y se analizaron con el sistema i-STAT y el cartucho CG8+ (Abbot, EE.UU.).

3.4.3. Resonancia magnética

Los experimentos de Imagen de Resonancia Magnética se llevaron a cabo en el equipo Biospec BM 47/40 (Bruker Biospin, Ettlingen, Alemania) del CAI de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico de la UCM. Este equipo posee un campo magnético de 4.7 Teslas y está equipado con un sistema de gradientes de 6 cm de diámetro interno capaz de alcanzar un gradiente máximo de 450 mT/m.

Los animales fueron anestesiados empleando una mezcla de isoflurano en oxígeno y se mantuvieron anestesiados a lo largo de todo el experimento. Durante el tiempo de experimentación se monitorizó la respiración y la temperatura de los animales se mantuvo a 36 °C mediante un sistema de aire caliente. Para ello se empleó el sistema de monitorización de pequeños animales compatible con resonancia SAM 1025 (SA Instruments, Inc., New York, USA).

Los experimentos del tensor de difusión (DTI) se adquirieron empleando una secuencia de eco de espín. En este caso no fue posible emplear secuencias eco planares (EPI) debido al artefacto de susceptibilidad magnética producido por la presencia de los microcoils metálicos en dicho tipo de secuencias. Se adquirieron dos experimentos con la misma geometría, de modo que en uno de ellos se aplican los pulsos de transferencia de la magnetización y en el otro no. La resolución en el plano fue de 200x200 µm². Se adquirieron en total 14 experimentos para cada corte, 2 de ellos sin gradientes de difusión y 12 correspondientes a 12 direcciones diferentes de codificación de la difusión. El tiempo de repetición (TR) fue de 1 s y el tiempo de eco (TE) 28 s. Respecto a los valores de codificación de difusión se emplearon gradientes con una duración de 7 ms ($\delta = 7$ ms) y separados un tiempo de 14 ms ($\Delta = 14$ ms), de modo que el valor del factor b para todas las direcciones de codificación de la difusión fue de 1200 s/mm². Para el procesado de estos experimentos se ha empleado el programa ParaVision 6.0.1 (Bruker Biospin, Ettlingen, Alemania).

3.4.4. Tratamiento con bromodesoxiuridina (BrdU)

Para la administración de BrdU, ésta se disolvió en buffer fosfato salino. Para el estudio del número de nuevas neuronas generadas mediante la colocación de BrdU con el marcador de neuroblastos doblecortina (DCX), se llevó a cabo una ronda de inyecciones intraperitoneales diarias a una dosis de 100mg/Kg durante 5 días, comenzando 2 meses y medio tras la colocación de los microcoils.

3.5. Técnicas experimentales y determinaciones

3.5.1. Sacrificio de los animales y obtención de muestras

En función de la naturaleza de la muestra que se deseaba obtener, los animales fueron sacrificados por dos métodos diferentes:

Obtención de secciones histológicas de tejido fijado

Para la obtención de secciones histológicas, la eutanasia se realizó por perfusión intracardíaca. Para ello, tras anestesiarse al animal con isoflurano y dejar expuesto el corazón, se introdujo una cánula en el ventrículo izquierdo que bombea a través de la circulación corporal una solución de lavado, compuesta por tampón fosfato 0,1M. Seguidamente, esta solución fue reemplazada por una solución fijadora, compuesta por paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M. Una vez fijado el tejido, se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en la misma solución fijadora durante 24h a 4°C. Posteriormente se mantuvieron en una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato 0.1M a 4°C durante 48 horas para lograr su deshidratación; tras esto fueron congelados y conservados a -80C.

Finalmente, los cerebros se cortaron en secciones coronales de 30 µm de grosor utilizando un micrótopo de congelación (*Leica SM2000R; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany*). Las secciones obtenidas se conservaron en solución anticongelante (etilen-glicol 30%, glicerol 20% en tampón fosfato salino) a -20C hasta su procesamiento.

Obtención de tejido fresco

Para obtener muestras de tejido fresco para diferentes análisis, los animales fueron anestesiados con isoflurano y el corazón expuesto al igual que en el método anterior. Con una jeringa de 25G pre-tratada con citrato sódico al 3,8% se extrajo sangre por punción cardíaca del ventrículo derecho, obteniéndose volúmenes en torno a 1mL. Al volumen obtenido se le añadió la solución anticoagulante de citrato (10% del volumen final) y fue inmediatamente centrifugada a 3500 rpm a 4°C durante 10 min con el fin de separar el plasma de los elementos formes de la sangre. La fracción plasmática se conservó a -80°C. Paralelamente se extrajo el cerebro del animal, del que se diseccionó selectivamente el hipocampo, así como el bazo en el caso de los experimentos de citometría de flujo. Todas las muestras de tejido fueron utilizadas inmediatamente o congeladas a -80°C hasta su uso.

Homogeneización de proteínas

Para la obtención de proteínas procedentes del tejido del hipocampo, éstos se homogeneizaron a 4°C mediante ultrasonidos en un volumen de 150 µL de una solución de homogeneización consistente en: cloruro sódico (150 mM), los inhibidores de proteasas *Nonidet P40* (0.5%, Roche), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1mM) y complete™ protease inhibitor cocktail (según indicaciones del fabricante; Roche), los inhibidores de fosfatasa PhospoStop (según indicaciones del fabricante; Roche) y fluoruro de sodio (50 mM), y el agente reductor ditiotreititol (1mM) en Tris-HCL (50 mM, pH 7,5). Tras la homogeneización las muestras se centrifugaron a 13000 g durante 15 min a 4°C y se recogieron los sobrenadantes. Para la determinación de la concentración de proteína se utilizó el método de Bradford (Bradford 1976). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

3.5.2. Técnicas experimentales

3.5.2.1. Tinción de Nissl y medida de volúmenes de hipocampo

El análisis en detalle de la tinción de Nissl permite la evaluación de cambios morfológicos celulares, lo que permite identificar la presencia de tejido infartado. El colorante empleado, violeta de cresilo, tiñe los denominados cuerpos de Nissl, cúmulos de retículo endoplasmático rugoso que se corresponden con síntesis de proteínas. La pérdida de estos corpúsculos en el tejido infartado se manifiesta como un área hipocromática. Para realizar la tinción histológica de Nissl se utilizaron las secciones coronales de cerebro de ratón obtenidas a 30µm. Estas secciones se montaron en portaobjetos superfrost (*Thermo Scientific*), se dejaron secar, se hidrataron en agua destilada y se tiñeron con una solución de acetato de violeta de cresilo al 0,5% (Sigma Aldrich). Las muestras teñidas se sometieron a una deshidratación utilizando un gradiente creciente de alcoholes (75%, 90% y 100% etanol) y finalizando con sustituto de xileno. Para su visualización se montaron en medio de montaje DPX (Sigma Aldrich). Además, utilizando un microscopio óptico (*Nikon Eclipse 80i Nikon Corporation*) acoplado al software *Stereoinvestigator 6 (MicroBrightfield Inc*, se llevó a cabo la medida de volúmenes de hipocampo, giro dentado, así como del grosor de la capa granular mediante estimación por Cavalieri (Michel and Cruz-Orive 1988). El tamaño del *grid* empleado para el cálculo del volumen de hipocampo y del giro dentado fue de 100 y 20 µm², respectivamente (**Figura 19**).

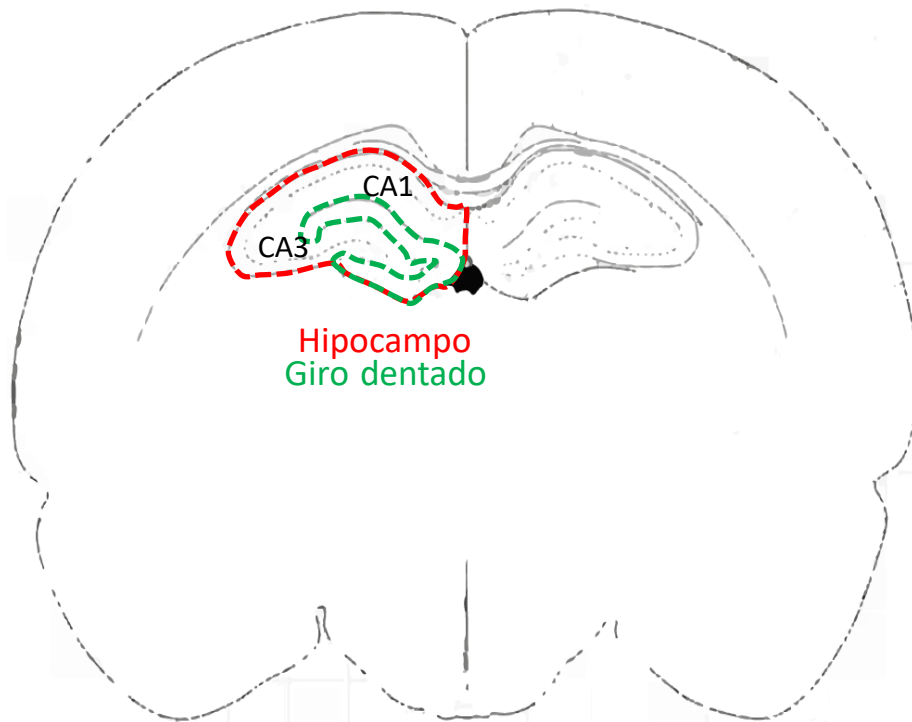


Figura 19. Representación de las medidas de hipocampo y giro dentado.

3.5.2.1. Inmunofluorescencia

Para llevar a cabo los ensayos de inmunofluorescencia se tomaron secciones correspondientes al hipocampo completo (desde -1.06 mm hasta -2.80 mm relativo a bregma, según “*The mouse brain stereotaxic coordinates*”; Paxinos et al., 2001), separadas 300µm entre sí. Las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con la correspondiente solución de bloqueo durante 2h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 1**) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las secciones se lavaron 3 veces en 0,25% Triton-KPBS y se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios durante 2h a TA y en oscuridad (**Tabla 1**). Finalmente, se realizó el montaje de las secciones sobre portaobjetos gelatinizados utilizando medio de montaje para fluorescencia *Aqua Poly/Mount* (*Polysciences Inc.*).

Epítipo	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Anticuerpo terciario	Suero de bloqueo
Doblecortina	Anti DCX (ab18723, Abcam) 1:250	Anti conejo biotinilado (cabra) (Vector Lab.) 1:500	Streptavidina- Alexa Fluor 488 (Invitrogen) 1:500	Suero de cabra (Jackson)
Ki67	Anti Ki67 (ab16667, Abcam) 1:200	Donkey vs rabbit Cy3 1:200		Suero de burro
Iba-1	Anti Iba-1 (019-19741, Wakko) 1:250	Anti conejo biotinilado (cabra) (Vector Lab.) 1:750	Streptavidina- Alexa Fluor 488 (Invitrogen) 1:500	Suero de cabra

IgG	Anti IgG biotinilado (cabra) (Vector Lab.) 1:500		Streptavidina- Alexa Fluor 488 (Invitrogen) 1:400	Suero de cabra
Nestina	Anti Nestin (gallina) (Aves Laboratories) 1:200	Anti gallina 488 (Thermo) 1:300		Suero de cabra
GFAP	Anti GFAP (gallina) (Thermo) 1:500	Anti gallina 647 (Thermo) 1:300		Suero de burro
CD31	Anti CD31 (rata) (BD Pharm.) 1:300	Anti rata Cy3 (burro) (Vector Lab.) 1:250		Suero de burro
NIMPR14	Anti NIMPR14 (rata) (ab2557, abcam) 1:200	Anti rata 647 (burro) (Jackson) 1:200		Suero de burro
Elastasa	Anti neutrophil elastase (conejo) (ab68672, abcam) 1:500	Anti conejo Cy3 (burro) 1:200		Suero de burro
Histona	Anti histona H3 (conejo) (ab5103, abcam) 1:400	Anti conejo 488 (burro) (Lifetech) 1:200		Suero de burro

Tabla 1. Anticuerpos y sueros empleados en los experimentos de inmunofluorescencia.

3.5.2.2. Barrera hematoencefálica y presencia de células infiltradas

El análisis de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) se llevó a cabo mediante el análisis por microscopía de fluorescencia de la extravasación de la inmunoglobulina G (IgG). La IgG plasmática es extravasada al parénquima de manera proporcional a la permeabilidad de la BHE. Para ello, tras la tinción por inmunofluorescencia de IgG, el área de IgG extravasada al parénquima en el hipocampo fue contabilizado mediante el software *Stereoinvestigator 6* (*MicroBrightfield Inc.*) utilizando la estimación por Cavalieri (Michel and Cruz-Orive 1988). El tamaño del *grid* empleado fue de 20 μm^2 .

Para la evaluación de la presencia de células infiltradas en el tejido se realizó el marcaje por inmunofluorescencia de los neutrófilos mediante NIMPR14. Conjuntamente a NIMPR14 se realizó el marcaje de histona y elastasa con el fin de determinar la presencia de trampas extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps, NETs*).

3.5.2.3. Vasculatura

Para el análisis de la vasculatura en el hipocampo se utilizó el marcador CD31, que corresponde con el marcador de adhesión endotelial PECAM-1. Para ello, se obtuvieron imágenes a 20x mediante microscopía confocal del giro dentado de ambos hemisferios en 3 secciones. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software *Volocity (Improvision)*. La densidad vascular se calculó como la suma de la longitud de los vasos (objetos identificados como CD31⁺) por unidad de volumen. La tortuosidad se calculó como el ratio entre la longitud y el eje más largo. Por último también se obtuvo el valor del diámetro de cada objeto.

3.5.2.4. Cuantificación de progenitores neurales en la ZSG

La cuantificación de neuroblastos (células DCX⁺), células progenitoras tipo 1 (nestina⁺/GFAP⁺) y tipo 2 (nestina⁺/GFAP⁻), así como células progenitoras proliferativas (nestina⁺/GFAP⁺/Ki67⁺ para los tipo 1, nestina⁺/GFAP⁻/Ki67⁺ para los tipo 2) se realizaron utilizando imágenes tomadas con un microscopio confocal (ZEISS LSM710) junto con el software de análisis ZEN 2008 (Carl Zeiss Microimaging GmbH). Por cada animal se tomaron fotos a 20x del hipocampo rostral completo de ambos hemisferios en 3-4 secciones de 30 µm consecutivas (distribuidas desde -1.34 mm a -2.70mm relativo a bregma). En ambos casos, el conteo de las células positivas se llevó a cabo manualmente y se estableció la media de células por sección en cada animal, bilateralmente.

3.5.2.5. Análisis morfológico de neuroblastos

El análisis morfológico de las células DCX⁺ (neuroblastos) se realizó a partir de imágenes del giro dentado de ambos hemisferios en 3-4 secciones de 30 µm consecutivas (desde -1.34 mm a -2.70mm relativo a bregma) obtenidas por microscopía confocal a 40x. Sobre dichas imágenes se realizó una densitometría con el software ImageJ de dos subestructuras del giro dentado: capa granular (GL) y capa molecular (ML). El resultado se expresó normalizado con respecto al número de somas en la zona subgranular (ZSG) por cada imagen.

3.5.2.6. Análisis de la microglía

Para analizar el estado de activación de la microglía se obtuvieron imágenes de células Iba-1⁺ mediante microscopía confocal a 40x. Para ello, se obtuvieron imágenes de 3-4 secciones de 30 µm consecutivas tanto del giro dentado como de la región CA1. Para el análisis se seleccionaron aleatoriamente un total de 8-10 células por animal. Utilizando el *plugin Simple Neurite Tracer* del software *FIJI* se realizó la reconstrucción de cada célula, así como la cuantificación total de las ramificaciones. Mediante el *plugin Sholl Analysis* del software *FIJI* se realizó el análisis Sholl.

3.5.2.7. Análisis de la población de linfocitos Th17

Las poblaciones de linfocitos Th17 fueron analizadas en bazo mediante citometría de flujo, previa estimulación con PMA/ionomicina/brefeldina A. La estimulación con PMA/ionomicina permite la acumulación de citoquinas que quedan retenidas en el interior celular gracias a la brefeldina A, un inhibidor del transporte de proteínas, lo que permite la detección intracelular de citoquinas que serían secretadas en condiciones normales. Para ello, una vez extraído del animal, el bazo se homogeneizó en 1mL de PBS con ayuda de un triturador de tejido, pasado consecutivamente por una punta de pipeta de 200 μ L y una jeringa de 1mL con una aguja de 25g y filtrado por un filtro de 40 μ m. A la suspensión celular resultante se le añadieron 14mL de solución de lisis (16,6 g de cloruro amónico, 2g de bicarbonato sódico y 0,074g de EDTA en 1 litro de agua) y se dejó actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se centrifugó a 1800 rpm durante 5 min a 4°C. El precipitado resultante fue lavado con PBS, centrifugado de nuevo y resuspendido en 5mL de RPMI. Para la estimulación se sembraron aproximadamente 10⁶ células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron con el siguiente cóctel de estimulación: PMA (100ng/mL; ab120297, Abcam), ionomicina (1 μ g/mL; ab120370, Abcam) y brefeldina A (3 μ g/mL; ab120299, Abcam) en un incubador durante 4 horas a 37°C. Pasado este tiempo las células fueron lavadas con RPMI, centrifugadas y resuspendidas en solución FACS estéril para proceder a la tinción. Para ello, tras bloqueo con el anticuerpo anti CD16 y CD32 (Fc-Block, Biolegend) durante 15 min a 4°C, se procedió a la tinción con el siguiente cóctel de anticuerpos: anti CD3 (PERcp, Biolegend), anti CD4 (FITC, Biolegend) y anti TCR $\gamma\delta$ (APC, Biolegend) en hielo y oscuridad durante 1h. A continuación, para realizar el marcaje intracelular de IL-17, las células fueron lavadas con solución FACS y resuspendidas en la solución de fijación (eBioscience) durante 30 min a 4°C. A continuación, se procedió al lavado e incubación con la solución de permeabilización (eBioscience) y el anticuerpo anti IL-17 (PE, eBioscience) durante 30min a 4°C. Finalmente las células fueron lavadas y resuspendidas en 200 μ L de solución FACS estéril y analizadas por medio de un citómetro de flujo FACsCalibur© (*Becton Dickinson S.A., EE.UU.*). Los datos adquiridos fueron analizados con el programa *FlowJO* (*TreeStar Inc., EE.UU.*). La estrategia para identificar la población Th17 se describe en la **Figura 20**. A partir del gráfico de tamaño y complejidad de la muestra (SSC vs. FSC) se delimitó la población correspondiente a los linfocitos. Esta población fue separada en función de los marcadores CD3 y TCR $\gamma\delta$, seleccionándose la población correspondiente a los linfocitos TCR $\alpha\beta$. Los linfocitos de esta última población fueron separados en función del marcaje intracelular de IL-17, cuantificándose finalmente el porcentaje de linfocitos presentes en la región positiva, respecto a la población inicial.

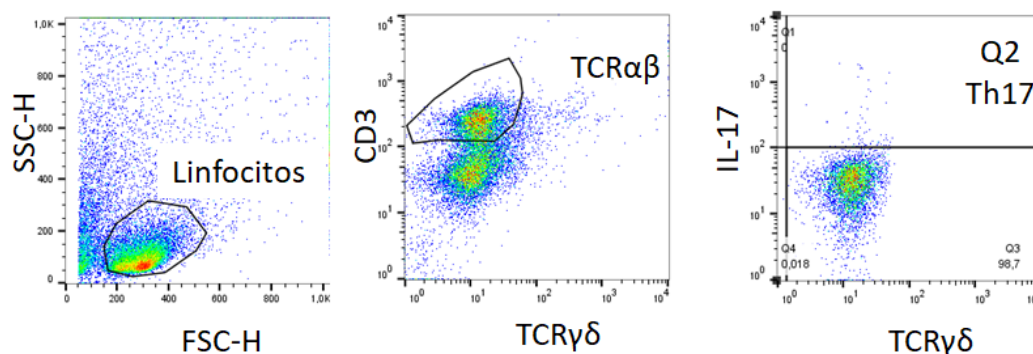


Figura 20. Marcadores utilizados para identificar la población de linfocitos Th17.

3.5.2.8. Cytometric Bead Array (CBA)

Con el objetivo de determinar los niveles circulantes de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ y TNF- α se utilizó un kit de citometría BD *Cytometric Bead Array* (BD Biosciences). Este ensayo permite analizar las diferentes citoquinas gracias a su unión específica a anticuerpos conjugados a microesferas de poliestireno de diferente tamaño que son identificados y diferenciados por citometría de flujo. Para ello, en primer lugar, los anticuerpos correspondientes a cada citoquina se conjugaron a las microesferas según las instrucciones del fabricante. A continuación, cada estándar o muestra se incubó durante 1h a TA junto con 50 μ L de la mezcla de microesferas en tubos de 75mm. A continuación a cada tubo se añadieron 50 μ L del reactivo de detección -una mezcla de anticuerpos conjugados a ficoeritina (PE)- y se incubaron de nuevo durante 1h a TA. Tras el lavado tanto de las muestras como de los patrones estándar, los tubos fueron centrifugados y el precipitado fue resuspendido en solución de lavado. El análisis se realizó en un citómetro de flujo. Los datos se adquirieron con el software *BD Cellquest™ PRO*. Para ello se definió una ventana de adquisición de FSC vs SSC con el fin de excluir las partículas de tamaños diferentes a los de las microesferas. Los datos se mostraron como diagramas de puntos de dos colores (FL-2 vs FL4), distribuyendo así las 8 intensidades de fluorescencia de micropartículas en FL4 a lo largo del eje Y (FL-2). La curva estándar para cada citoquina se dibujó por medio de un modelo de ajuste logístico de 4 parámetros (concentración del calibrador de proteína vs. intensidad de fluorescencia media en FL-2). La concentración de cada citoquina de las muestras se determinó de acuerdo a la correspondiente curva estándar. A los valores por debajo del valor mínimo de la curva estándar se les asignó una concentración de 0 pg/mL.

3.5.2.9. Determinación de los niveles de IL-17 en el hipocampo

Para la determinación de la concentración de la citoquina IL-17 en tejido de hipocampo se realizó un ensayo ELISA tipo sandwich a partir de los extractos de proteína obtenidos, según las indicaciones del fabricante (eBioscience). La concentración de proteína obtenida en el ensayo se normalizó según la cantidad de proteína presente en cada una de las muestras obtenida por el método de Bradford (Bradford 1976).

3.5.2.10. Cuantificación de los niveles de NETs en plasma

Para cuantificar los niveles de NETs en plasma se realizó un ensayo ELISA tipo *sandwich*. Para ello, la placa de 96 pocillos se tapizó con el anticuerpo anti elastasa (ab68672, Abcam) a una concentración de 1:250 a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se procedió al bloqueo con albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin, BSA*) al 5% durante 2h a temperatura ambiente. Seguidamente se incubó la muestra de plasma durante otras 2h en agitación. Finalmente se incubó con el anticuerpo anti DNA (procedente de *Cell Death Detection ELISA^{Plus} Kit*, Roche) a una concentración 1:100 en 1% BSA-PBS. Tras una incubación de 2h a temperatura ambiente en agitación se añadió ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, ABTS, Thermo) para el revelado. Tras una incubación final de 30 minutos se procedió a leer la densidad óptica a 405-490nm.

3.6. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM) usando el software Prism 8 para Windows (*GraphPad Software, Inc.*). Para el análisis estadístico se comprobaron la normalidad y homocedasticidad de los datos y se emplearon tests paramétricos o no paramétricos en consecuencia. Para la comprobación de dos grupos se utilizó el estadístico *t* de *Student* o el test de Mann-Whitney. Para la comparación de más de dos grupos, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido del correspondiente test de comparaciones múltiples. Se considera el valor de $p < 0.05$ estadísticamente significativo.

3.7. Diseño experimental

Los protocolos experimentales llevados a cabo durante la presente tesis doctoral para cada uno de los objetivos son los siguientes:

- **Objetivo 1.** Establecimiento de un modelo enfermedad cerebrovascular con alteraciones cognitivas mediante estenosis de las arterias carótidas (**Figura 21**).

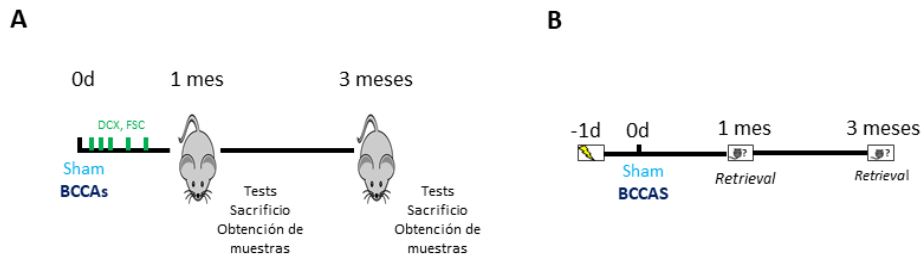


Figura 21. Diseño experimental llevado a cabo en el objetivo 1. **(A)** Diseño general de realización de tests comportamentales y obtención de muestras. **(B)** Diseño específico para el protocolo de evaluación de la memoria retrógrada mediante el test de CFC.

- **Objetivo 2.** Establecimiento de un modelo enfermedad cerebrovascular con alteraciones cognitivas a partir de una dieta alta en sodio (*high sodium diet, HSD*) (**Figura 22**).

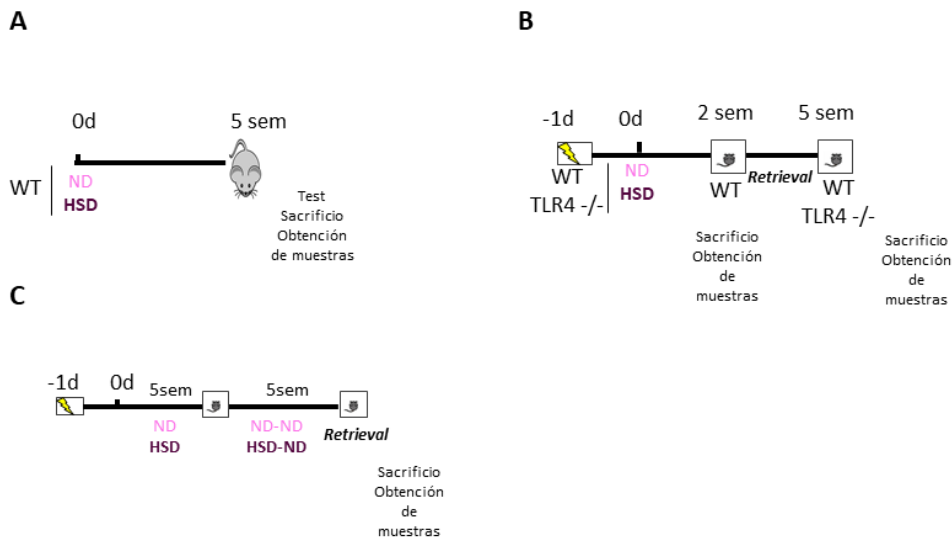
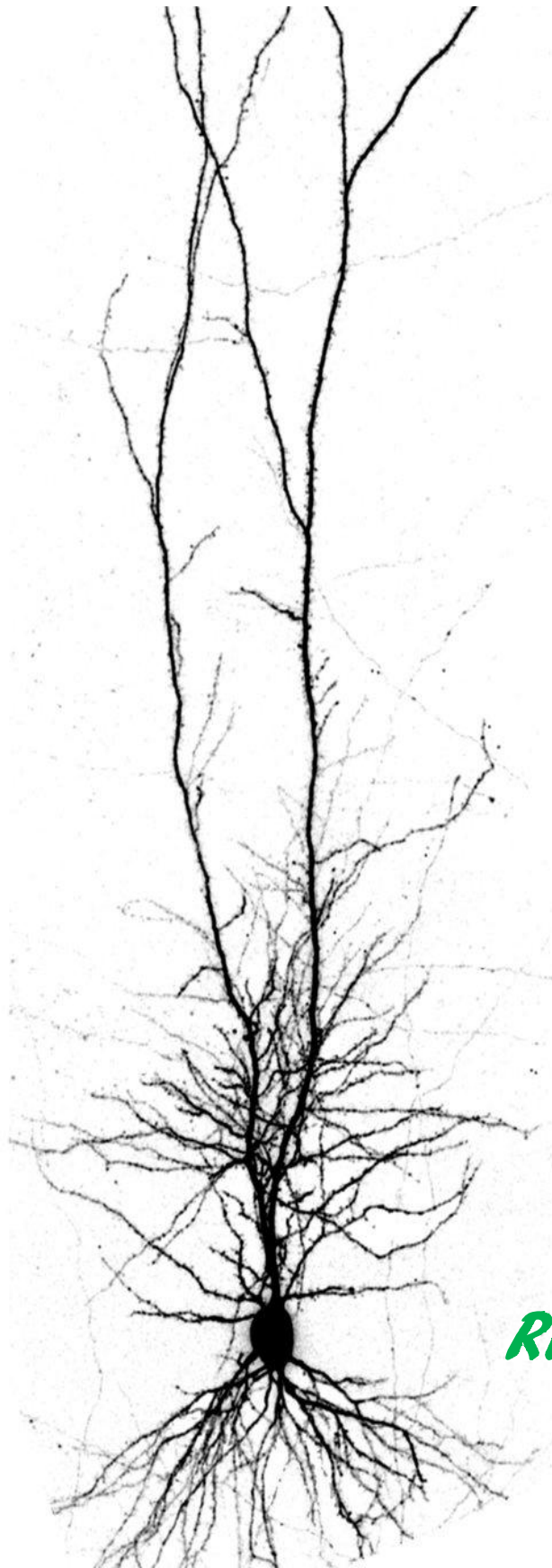


Figura 22. Diseño experimental llevado a cabo en el objetivo 2. **(A)** Diseño general para la realización de tests de memoria anterógrada y obtención de muestras. **(B)** Diseño específico para el protocolo de evaluación de la memoria retrógrada mediante el test de CFC, llevado a cabo tanto en animales *wild type* como TLR4^{-/-}. **(C)** Diseño específico para la evaluación de la reversibilidad del déficit cognitivo tras regreso a una dieta normal, realizado en animales *wild type*.



RESULTADOS

Con el propósito de determinar los posibles déficits asociados al modelo de hipoperfusión crónica cerebral, se llevó a cabo la evaluación, tanto cognitiva como motora, de animales sometidos a estenosis bilateral de las arterias carótidas comunes (BCCAs). Para ello se realizó una batería de tests comportamentales que evalúan diferentes aspectos cognitivos que se encuentran generalmente alterados dentro del espectro del deterioro cognitivo vascular, como la memoria dependiente de hipocampo, la función motora o la aparición de comportamientos relacionados con ansiedad y depresión.

4.1. Caracterización de los déficits cognitivos asociados al modelo BCCAs

4.1.1. Alteraciones de la memoria dependiente de hipocampo en el modelo BCCAs

En primer lugar, se evaluó si la hipoperfusión cerebral crónica podría afectar a tareas de memoria dependientes del hipocampo, así como el tiempo de hipoperfusión en el que se presentan alteraciones detectables a nivel comportamental. Para evaluar la formación de nuevos recuerdos (protocolo anterógrado), se realizaron los tests del laberinto en Y así como de nueva localización de objeto (NLO), tanto 1 mes tras la colocación de los *microcoils* como tras 3 meses. Para la evaluación de recuerdos formados anteriormente (protocolo retrógrado) se realizó el test de condicionamiento al miedo contextual, realizándose el condicionamiento de manera previa a la colocación de los *microcoils* y el *retrieval* pasados 1 o 3 meses (**Figura 23**).

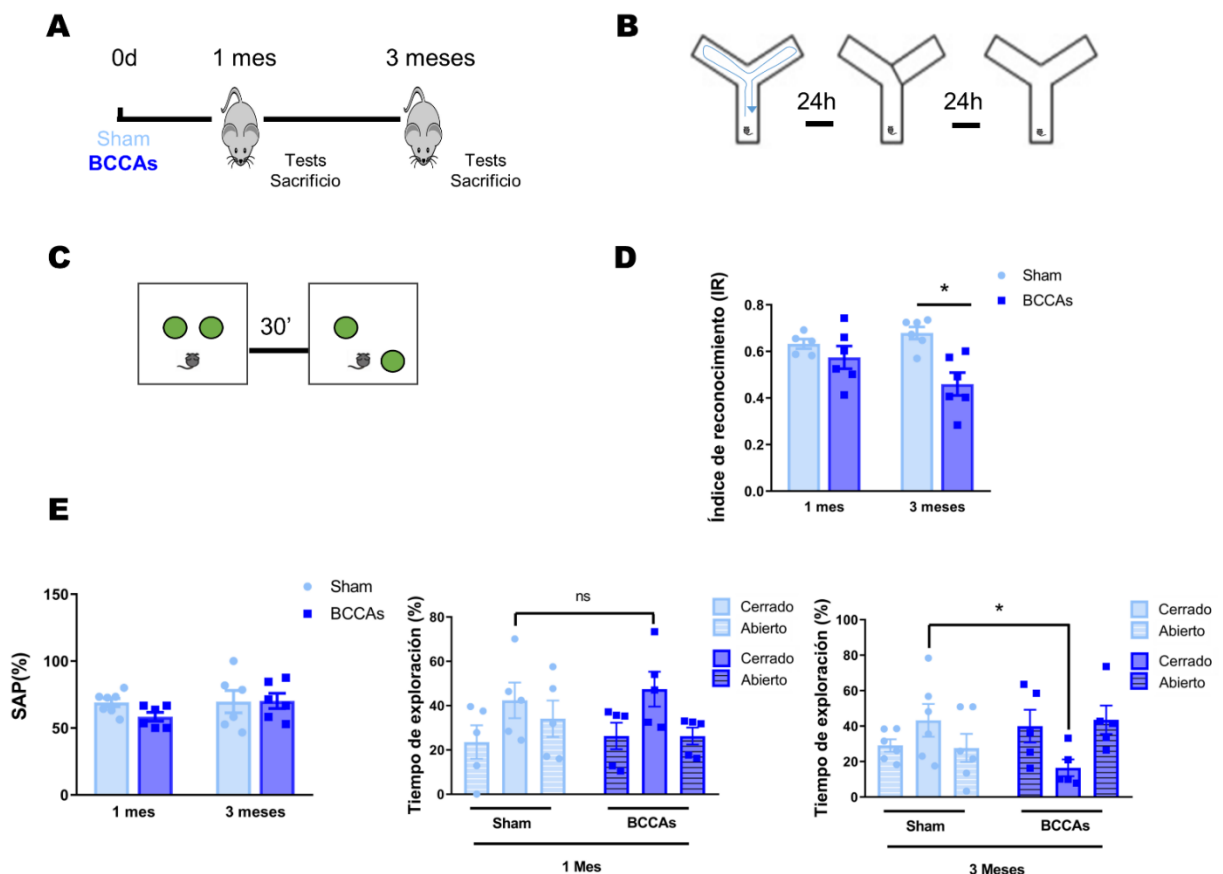


Figura 23. Evaluación de la memoria mediante un protocolo anterógrado en el modelo BCCAs. **(A)** Diseño experimental general. **(B)** Diseño experimental en el laberinto en Y. **(C)** Diseño experimental en el NLO. **(D)** Análisis del índice de reconocimiento del nuevo objeto en el test NLO. **(E)** Análisis de la alternancia espontánea (SAP) y del tiempo de exploración del brazo cerrado en el laberinto en Y. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías (D y E-alternancia espontánea) con post-test de Bonferroni y T de Student (E-tiempo de exploración, brazo cerrado sham vs brazo cerrado BCCAs) (n=5-7 por grupo, *p<0.05).

En los tests realizados con un protocolo anterógrado, observamos cómo los déficits aparecen únicamente tras 3 meses de hipoperfusión (**Figura 23**), tiempo en el que los animales presentan una menor exploración del brazo cerrado del laberinto en Y, a pesar de alternar de igual forma entre todos los brazos (**Figura 23B-E**), lo que nos indica que las diferencias se deben a un menor tiempo de exploración y no a una posible aversión por alguno de los brazos. Del mismo modo, tras 3 meses de hipoperfusión, los animales no son capaces de discriminar entre el objeto que ha sido cambiado de posición y el que se mantiene en su sitio en el test de nueva localización de objeto (**Figura 23C-D**). Estos resultados nos indican que los déficits en la memoria anterógrada dependiente de hipocampo se manifiestan en los tests empleados tras 3 meses, pero no tras 1 mes de hipoperfusión.

En el test realizado con un protocolo retrógrado, sin embargo, el déficit parece ser detectable tras solamente 1 mes de hipoperfusión mientras que, tras 3 meses, a pesar de observarse una tendencia, el nivel de *freezing* que muestran tanto los animales sham como los sometidos a hipoperfusión parece ser demasiado bajo para detectarse diferencias entre ambos grupos (**Figura 24A-B**).

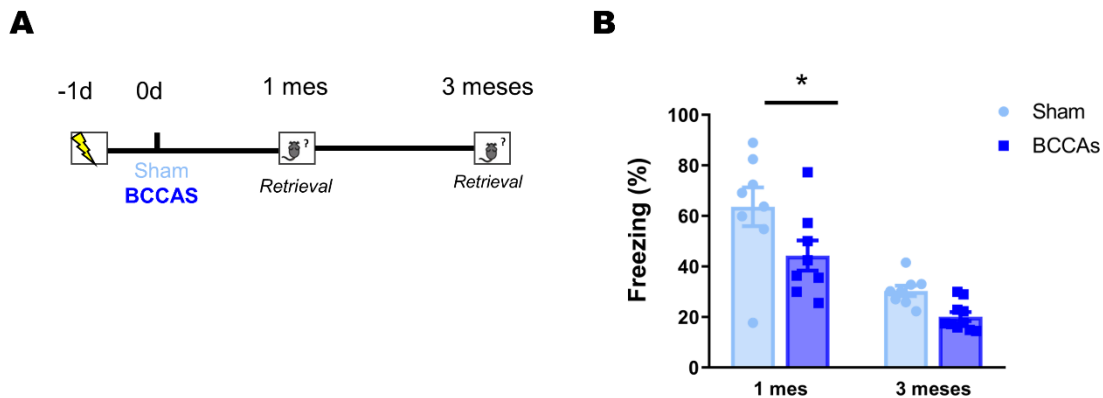


Figura 24. Evaluación de la memoria mediante un protocolo retrógrado en el modelo BCCAs. **(A)** Diseño experimental. **(B)** Análisis de la retención del recuerdo en el test de condicionamiento al miedo contextual representado como porcentaje de *freezing*. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n=8-10 por grupo, *p<0.05).

En conjunto, estos resultados nos indican que, en nuestro modelo de hipoperfusión cerebral, las alteraciones en la memoria retrógrada son detectables con anterioridad a los déficits en la capacidad de formar nuevos recuerdos.

4.1.2. Alteraciones motoras en el modelo BCCAs

Además de los déficits de memoria, una alteración común dentro del espectro del deterioro cognitivo vascular es la aparición de déficits a nivel motor (Roman et al. 2002), motivo por el cual decidimos evaluar la función motora en los animales sometidos a hipoperfusión. Para ello se realizaron tanto el test de la huella como el test motor de natación.

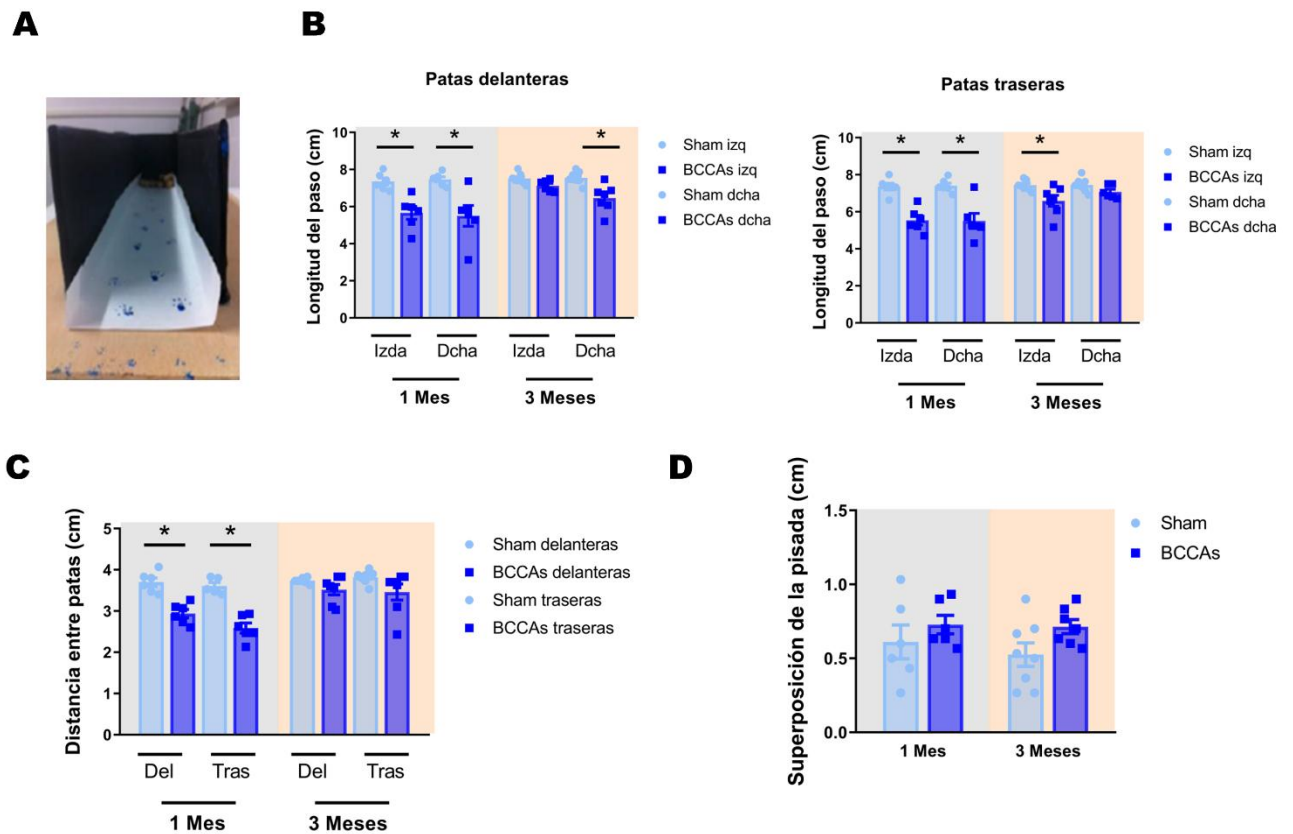


Figura 25. Análisis del patrón de la marcha mediante el test de la huella. **(A)** Imagen real del corredor empleado para el test. **(B)** Análisis de la longitud del paso tanto de las patas delanteras (izda) como traseras (dcha). **(C)** Análisis de la distancia entre las patas, tanto delanteras como traseras. **(D)** Análisis de la superposición de la pisada. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni ($n=6-8$ por grupo, $*p<0.05$).

En el test de la huella podemos observar tanto una menor longitud del paso como una menor distancia entre las patas en los animales sometidos a hipoperfusión respecto a los animales sham tras 1 mes (**Figura 25A-D**), diferencias que no en todos los casos se mantienen hasta los 3 meses, y sin diferencias significativas en la superposición de la pisada. En el test motor de natación, sin embargo, encontramos una menor velocidad de nado en los animales BCCAs solamente tras 3 meses de hipoperfusión (**Figura 26**). En conjunto, estos datos nos indican que las alteraciones de coordinación y equilibrio, evaluadas mediante el test de la huella, aparecen principalmente en tiempos tempranos de hipoperfusión, mientras que las diferencias en la habilidad de nado aparecen en tiempos más tardíos.

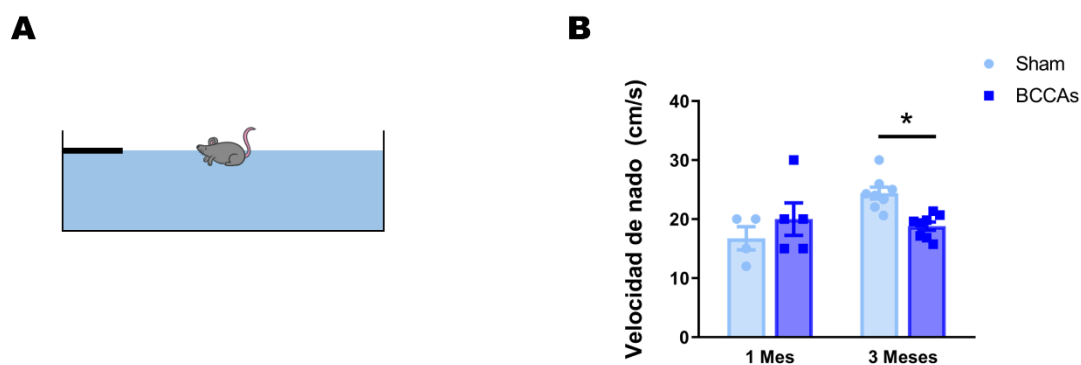


Figura 26. Evaluación motora del modelo BCCAs mediante el test motor de natación. **(A)** Representación esquemática de la piscina empleada. **(B)** Análisis de la velocidad de nado de los animales sham y BCCAs. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni ($n=4-8$ por grupo, $*p<0.05$).

4.1.3. Evaluación de comportamientos de ansiedad y depresión en el modelo BCCAs

Otra de las manifestaciones características del deterioro cognitivo vascular es la aparición de síntomas relacionados con el estado anímico, como ansiedad o depresión, generalmente asociados a estadios tardíos, ya dentro de lo que se consideraría demencia vascular. Por ello nos propusimos evaluar comportamientos relacionados tanto con ansiedad como con depresión en nuestro modelo de BCCAs, empleando el test de campo abierto, como indicador de ansiedad, y el test de natación forzada de Porsolt, como indicador de conductas depresivas en los animales.

En ninguno de los dos tests encontramos diferencias significativas entre animales sham y BCCAs en ninguno de los tiempos estudiados, ni en cuanto al tiempo transcurrido en el centro del recinto, ni a la distancia en el test de campo abierto (**Figura 27 A-C**), ni en cuanto al tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada de Porsolt (**Figura 27D**).

Estos datos nos indican que, mediante los tests empleados, tanto tras 1 como 3 meses de hipoperfusión no se detectan comportamientos asociados a ansiedad o depresión en los animales BCCAs.

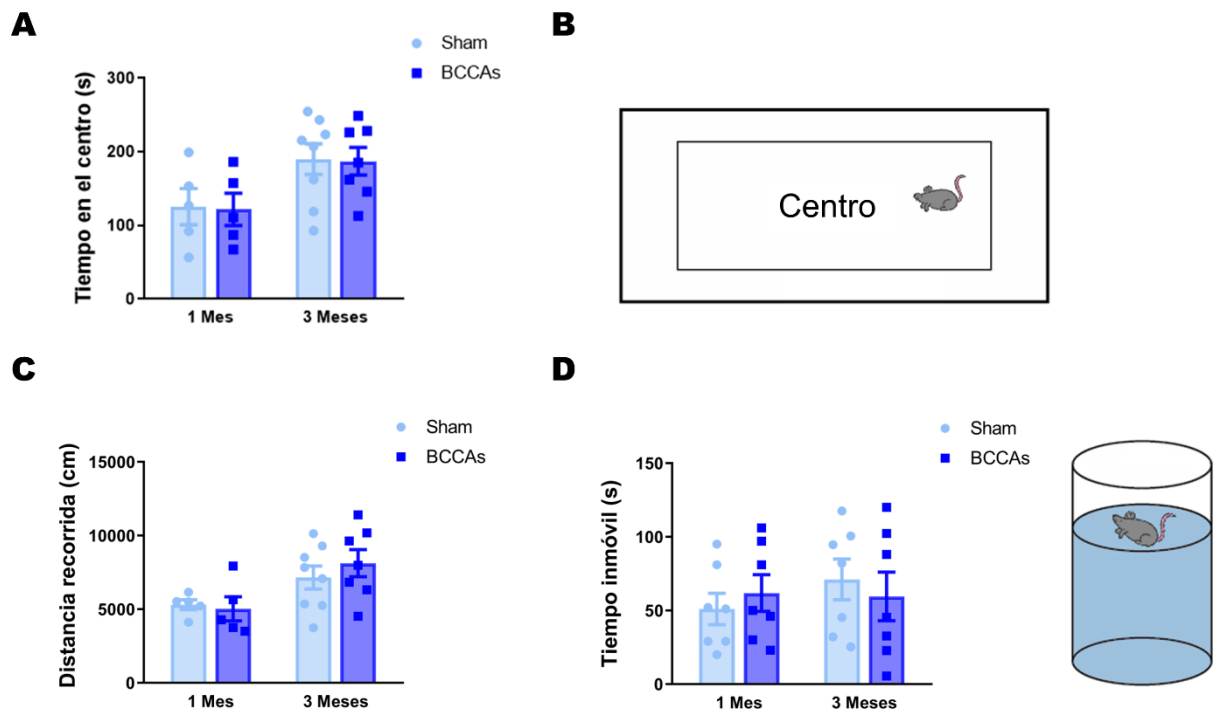


Figura 27. Evaluación de conductas de ansiedad y depresión en el modelo BCCAs. **(A)** Análisis del tiempo pasado en el centro del campo abierto. **(B)** Representación esquemática del recinto de campo abierto empleado. **(C)** Distancia recorrida por los animales durante todo el tiempo de ensayo de campo abierto. **(D)** Análisis del tiempo de inmovilidad de los animales sham y BCCAs durante el test de natación forzada de Porsolt. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni ($n=5-8$ por grupo).

4.2. Estudio de mecanismos implicados en el deterioro cognitivo en el modelo BCCAs como posibles dianas terapéuticas.

Dado que los animales BCCAs desarrollan déficits de memoria, decidimos estudiar los posibles mecanismos implicados en el deterioro cognitivo en estos animales. Puesto que las alteraciones de memoria dependiente de hipocampo resultan una de las principales manifestaciones del deterioro cognitivo vascular, decidimos determinar los efectos del modelo BCCAs centrándonos principalmente en esta estructura cerebral.

4.2.1. Evaluación del daño isquémico y alteraciones anatómicas hipocampales

En primer lugar, se llevó a cabo una valoración del daño isquémico hipocampal mediante el análisis cualitativo de la tinción de Nissl, clasificándose los animales según presentasen o no un daño aparente o se detectase la presencia de infartos en la formación hipocampal. Los resultados, que se resumen en la **Tabla 2**, no muestran diferencias significativas entre animales sham y BCCAs en ninguno de los dos tiempos estudiados.

Tabla 2. Análisis cualitativo del daño isquémico de los animales BCCAs. Datos analizados con el estadístico de Fisher.

BCCAS	Sin daño aparente	Micro infartos
1 mes	6/6	0/6
3 meses	4/6	2/6

En segundo lugar, se realizó un análisis global del volumen hipocampal, tanto del hipocampo completo como del giro dentado, tras 1 y 3 meses de hipoperfusión (**Figura 28A-C**), no observándose tampoco en este caso diferencias significativas entre grupos.

En conjunto, estos resultados nos indican que, tanto tras 1 mes como tras 3 meses, la hipoperfusión cerebral no causa daños isquémicos significativos ni altera el volumen hipocampal global o del giro dentado.

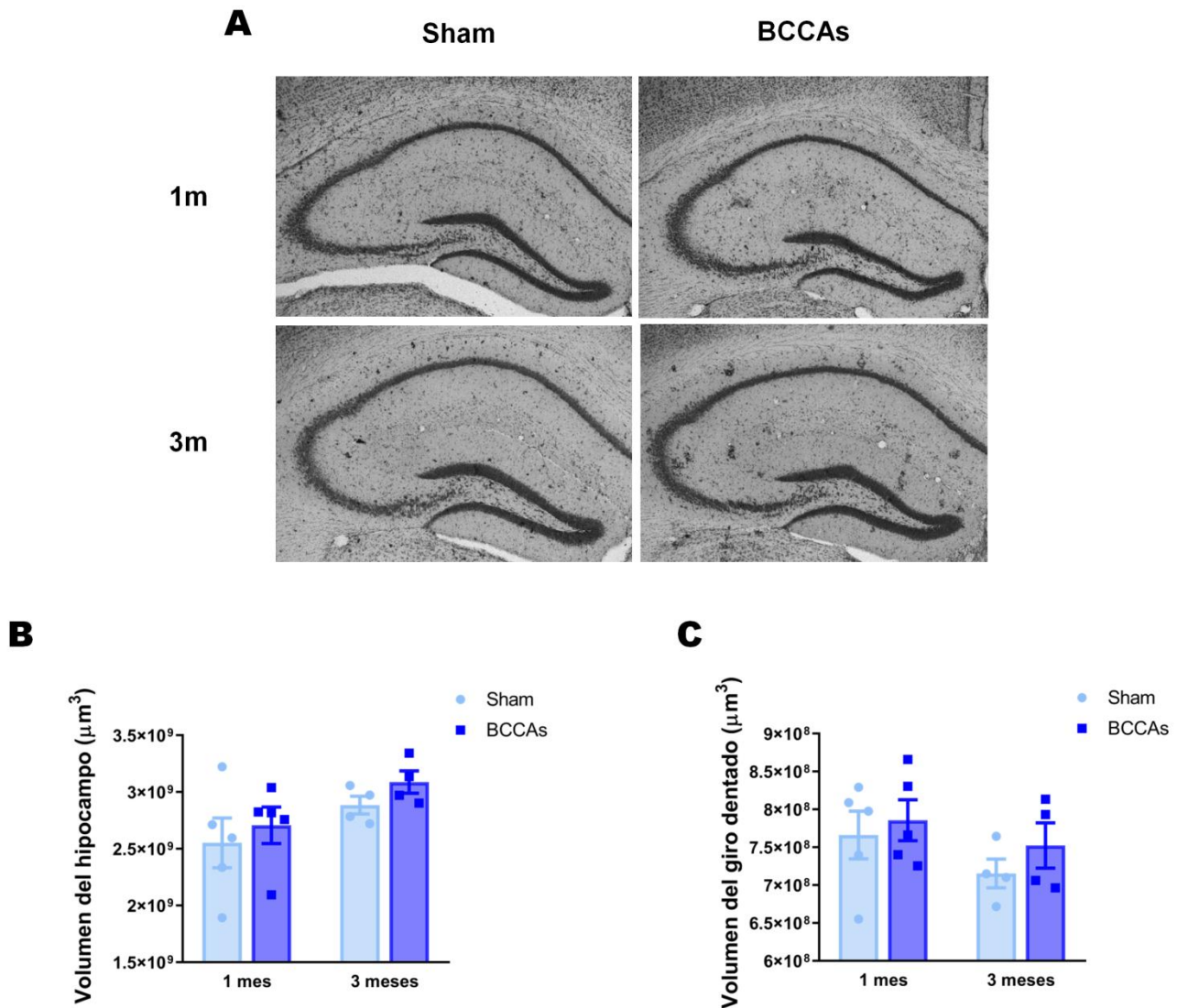


Figura 28. Evaluación de los cambios anatómicos hipocampales en el modelo BCCAs. Imágenes representativas (A) y cuantificación del volumen hipocampal (B) y del giro dentado (C) en animales sham y BCCAs tras 1 y 3 meses de hipoperfusión. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n=4-5 por grupo).

4.2.2. Evaluación de la integridad de la sustancia blanca en el modelo BCCAs

Teniendo en cuenta que los cambios en la sustancia blanca son una de las características patológicas del DCV, decidimos determinar la integridad de la sustancia blanca en los animales sometidos a BCCAs. Para ello se realizaron estudios de DTI por resonancia magnética *in vivo*. Mediante esta técnica se analizó la fracción de anisotropía (FA), parámetro que proporciona un mapa en 2D en escala de grises con intensidades comprendidas entre 0 y 1. Estos valores describen el grado de anisotropía de un proceso de difusión, siendo próximos a 0 cuando la difusión es isotrópica y acercándose a 1 cuando es anisotrópica (Assaf and Pasternak 2008). Para la sustancia blanca, valores cercanos a 0, correspondientes a una difusión isotrópica, indican la disrupción de la sustancia blanca, que en condiciones normales limita la difusión a una sola dirección (anisotrópica, con valores cercanos a 1). A partir de estos mapas se obtuvieron los valores de FA de varias regiones cerebrales de interés (**Tabla 3**). Se seleccionaron regiones implicadas en la conectividad de la formación hipocampal (hipocampo, fimbria y fórnix), en la conectividad intrahemisférica (cuerpo caloso y comisura anterior), en el control motor (cápsula interna y estriado), en el procesamiento cognitivo (corteza y corteza prefrontal), así como el tálamo, dada su implicación en los procesos de memoria según algunos autores (Arias et al. 2015, Troyner et al. 2018).

Tabla 3. Resultados del análisis de la fracción de anisotropía (FA) mediante DTI-IRM en el modelo BCCAs. Datos analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n=2-4 por grupo, *p<0.05).

Región de interés	1 Mes		3 Meses		Significación
	FA Sham	FA BCCAs	FA Sham	FA BCCAs	
Hipocampo	0,327±0,01775	0,3208±0,01522	0,3002±0,00450 0	0,2821±0,02008	Ns
Cuerpo caloso	0,4963±0,01767	0,4715±0,00648 7	0,4707±0,00166 7	0,4600±0,01433	Ns
Comisura anterior	0,5224±0,01119	0,4902±0,02650	0,5428±0,01917	0,3673±0,00391 7*	Sí
Capsula interna	0,4412±0,01167	0,4251±0,01312	0,4750±0,00250 0	0,4163±0,02433	Ns
Estriado	0,3046±0,00575	0,2946±0,01777	0,2875±0,01217	0,2878±0,01358	Ns
Corteza	0,3118±0,003750	0,2910±0,01081	0,2660±0,0172	0,2834±0,02301	Ns
Corteza prefrontal	0,3282±0,000343 0	0,3080±0,01520	0,2919±0,01040	0,3144±0,01459	Ns
Tálamo	0,3364±0,01338	0,3187±0,01368	0,2904±0,02788	0,2761±0,00787 5	Ns
Fimbria	0,4425±0,004500	0,4128±0,00392 2	0,4433±0,03100	0,4532±0,03417	Ns
Fórnix	0,49305±0,0530	0,4575±0,00480 5	0,4300±0,0140	0,4645±0,01450	Ns

A pesar de que solamente encontramos diferencias significativas en una de las estructuras estudiadas, la comisura anterior, estos datos sugieren que la integridad de los haces de fibras que conectan los dos lóbulos temporales se encuentra alterada tras 3 meses

de hipoperfusión (**Tabla 3**), lo que nos indica una posible disfunción de la conectividad interhemisférica en los animales BCCAs.

4.2.3. Caracterización de la neurogénesis hipocampal en el modelo BCCAs

Dada la importancia de las nuevas neuronas generadas en el giro dentado en el almacenamiento de la memoria (Bruel-Jungerman et al. 2007, Drew and Huckleberry 2017), y puesto que alteraciones en la neurogénesis hipocampal se han visto implicadas en distintas patologías como la enfermedad de Alzheimer o la demencia post-ictus (Cuartero et al. 2019a, Donovan et al. 2006, Han et al. 2016, Moreno-Jimenez et al. 2019, Rodriguez et al. 2008, Tobin et al. 2019), se procedió a estudiar si la hipoperfusión cerebral provocaba cambios en la respuesta neurogénica que pudiesen estar implicados en el deterioro cognitivo. Dados los importantes cambios en el FSC que se observan en los primeros días tras la colocación de los *microcoils*, esta respuesta neurogénica se estudió en dos periodos de tiempo diferentes dentro del modelo BCCAs: de modo agudo/a corto plazo, correspondiendo a cambios detectables desde las 24h tras la cirugía hasta los 14 días posteriores, y a modo crónico/a largo plazo, correspondientes con cambios detectables tras 1 y 3 meses de hipoperfusión.

Podemos observar cómo a corto plazo tras la cirugía, la implantación de los *microcoils* no provoca cambios significativos en el número de neuroblastos (**Figura 29B superior**), mientras que, a largo plazo, el efecto de la hipoperfusión resulta en una disminución del número de nuevas neuronas inmaduras en los animales sometidos a BCCAs durante tres meses con respecto a los animales sham (**Figura 29A y B inferior**).

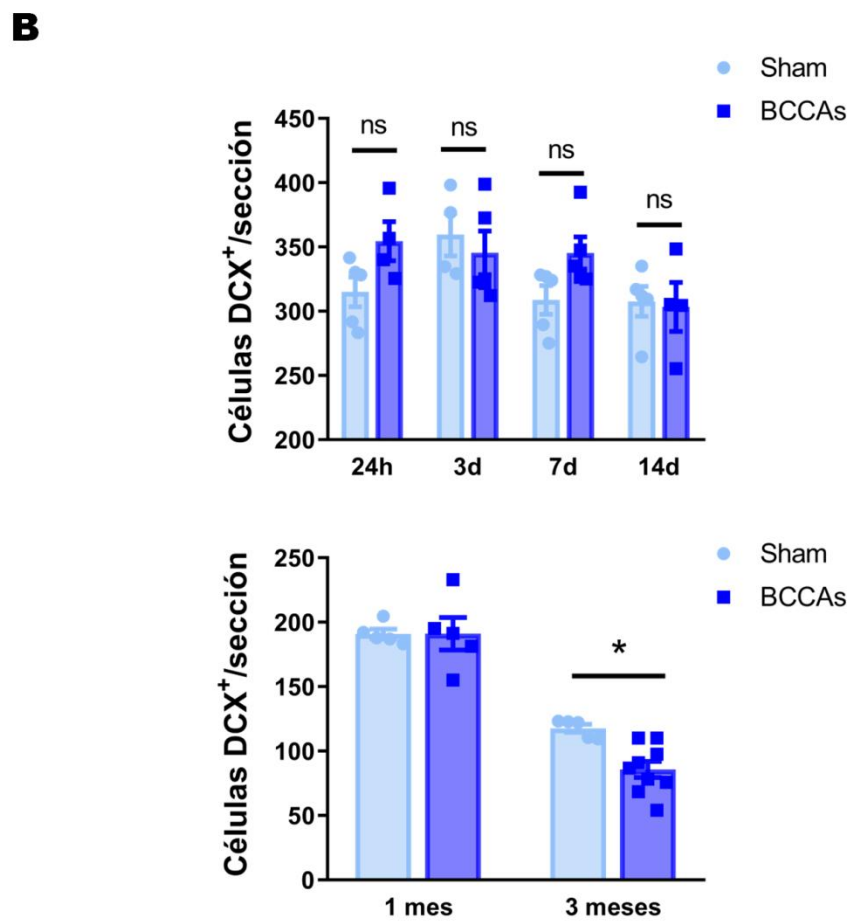
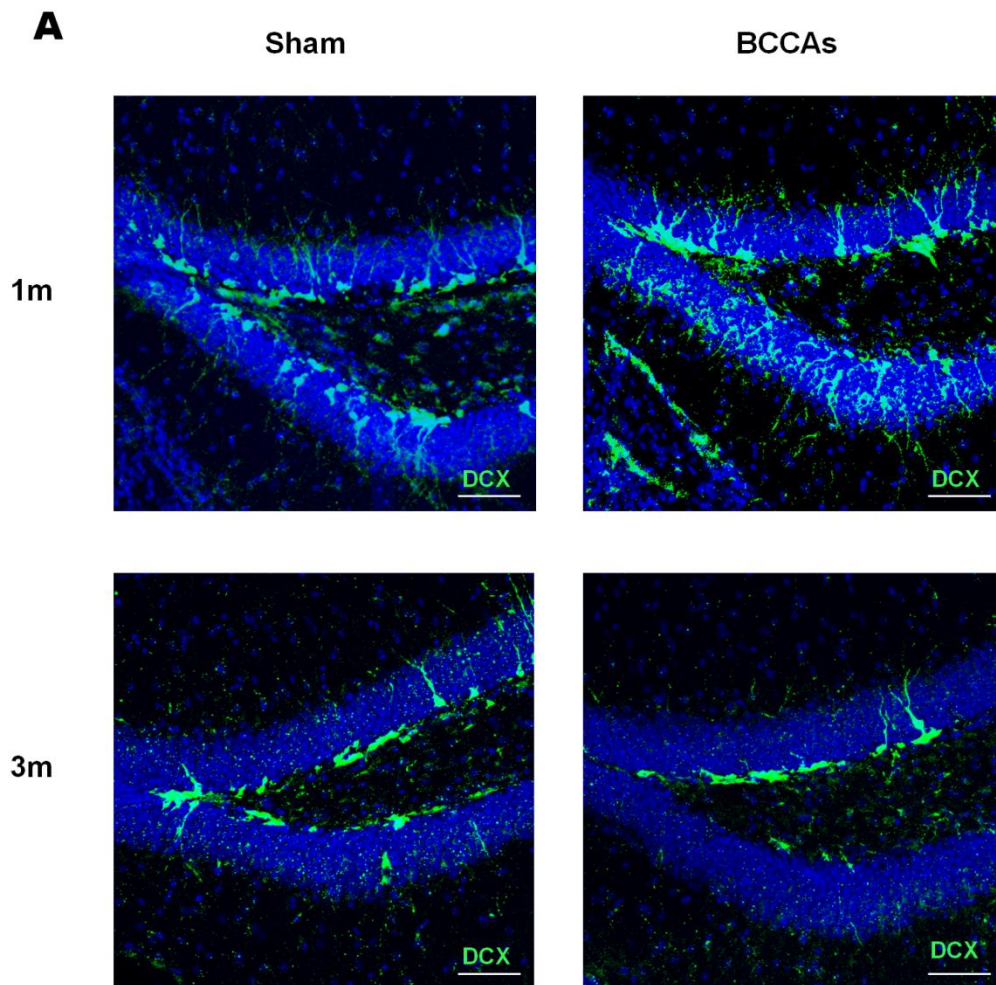
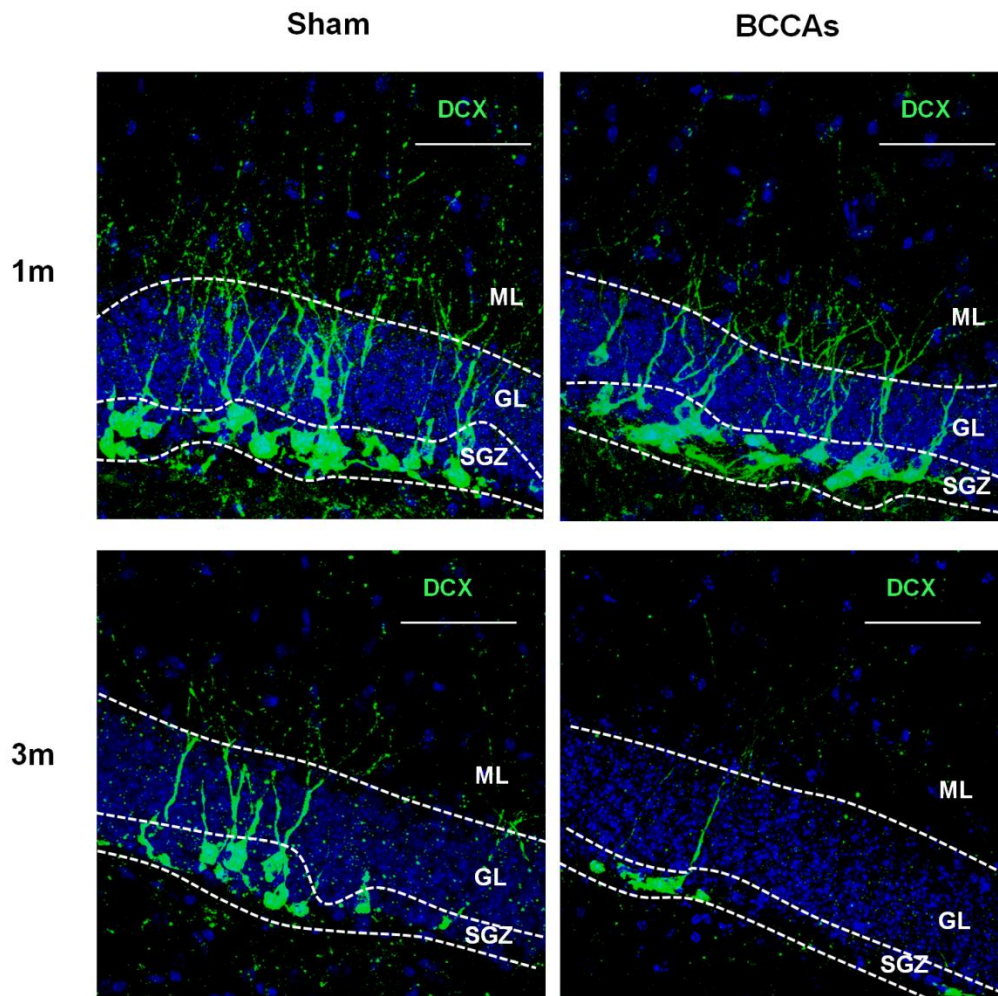


Figura 29. Cambios en el número de neuroblastos en la ZSG en el modelo BCCAs. **(A)** Imágenes representativas de células DCX+ en animales sham y BCCAs tras 1 y 3 meses de hipoperfusión. **(B)** Perfil temporal a corto plazo (**superior**) y a largo plazo (**inferior**) del número de neuroblastos en la ZSG en animales sham y BCCAs. En ambos casos se encontró una interacción significativa entre el tiempo y el número de células DCX+, encontrándose únicamente diferencias significativas entre grupos tras 3 meses de hipoperfusión. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n=4-9 por grupo). Escalas = 50 micras.

En vista de las diferencias encontradas en el número de neuroblastos se procedió a evaluar la existencia de alteraciones en la morfología de los mismos, puesto que patrones de arborización dendrítica aberrantes se han visto relacionados con el deterioro cognitivo post-ictus así como con la enfermedad de Alzheimer (Crews et al. 2010, Cuartero et al. 2019b). Para ello se caracterizó la distribución de la arborización dendrítica de las nuevas neuronas DCX+ a lo largo de la capa granular y de la capa molecular del giro dentado.

Nuestros resultados no muestran diferencias significativas en la arborización dendrítica en los animales BCCAs con respecto a los animales sham ni tras 1 ni 3 meses de hipoperfusión, en ninguna de las dos subregiones del GD analizadas (**Figura 30**).

A



B

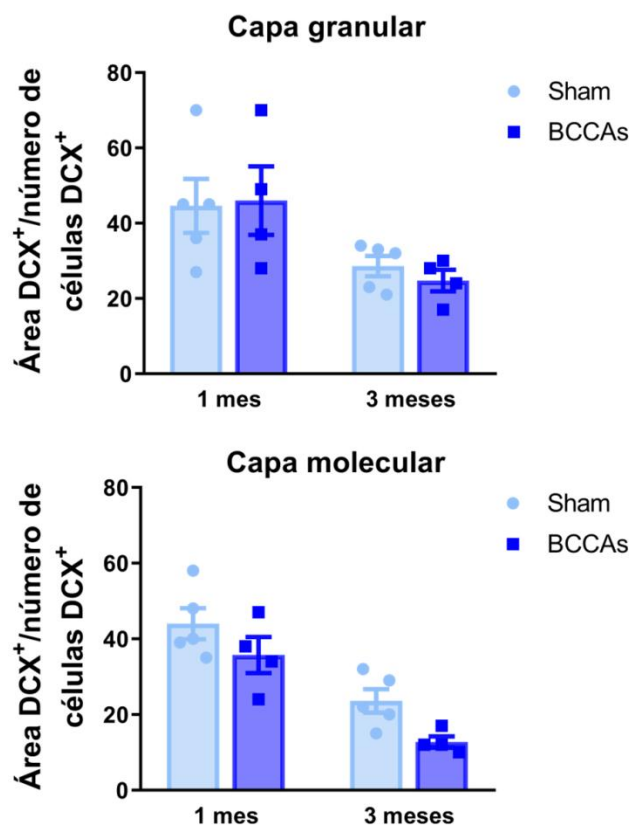


Figura 30. Análisis del patrón de arborización dendrítica de las nuevas neuronas DCX+ en la ZSG del giro dentado. **(A)** Imágenes representativas de la morfología de las neuronas DCX+ en la ZSG. **(B)** Cuantificación del área DCX+ entre el número de células DCX+ en la capa granular (**superior**) y en la molecular (**inferior**). Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n=4-5 por grupo). Escalas = 50 micras. ML: Molecular layer (capa molecular), GL: Granular layer (capa granular), SGZ: Subgranular zone (zona subgranular).

Además, con el fin de determinar si el menor número de nuevas neuronas DCX⁺ encontrado tras 3 meses de hipoperfusión es debido a una alteración en la proliferación de los progenitores neurales, se estudió la proliferación mediante la administración de BrdU a los 2,5 meses de hipoperfusión. La evaluación del número de nuevas neuronas BrdU⁺/DCX⁺ realizado pasados 3 meses de hipoperfusión no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**Figura 31**).

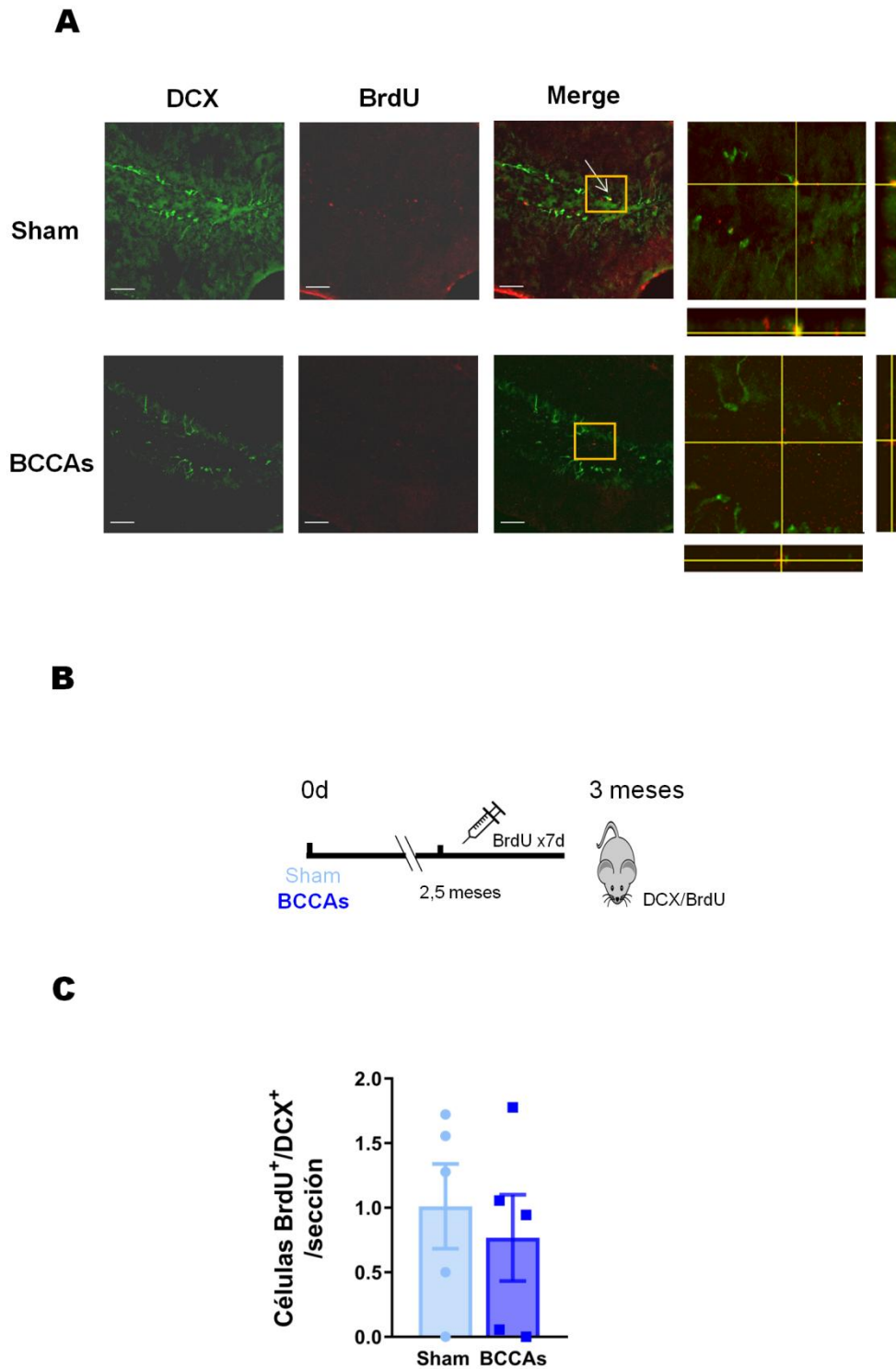


Figura 31. Evaluación de la formación de nuevas neuronas en el modelo BCCAs. **(A)** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica BrdU/DCX. **(B)** Diseño experimental de la administración de BrdU. **(C)** Análisis de las nuevas neuronas BrdU⁺/DCX⁺ tras 3 meses de hipoperfusión. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante t-Student (n=5-6 por grupo). Escalas = 50 micras.

4.2.4. Alteraciones neuroinflamatorias: respuesta microglial en el hipocampo.

Teniendo en cuenta el papel que juega la activación microglial en respuesta a la hipoperfusión tanto en regiones de materia blanca como en el cuerpo caloso (Shibata et al. 2004), así como la implicación de esta activación en numerosas enfermedades neurodegenerativas, quisimos estudiar si una respuesta similar estaba teniendo lugar en regiones no puramente de sustancia blanca, como el hipocampo. Para ello decidimos analizar los cambios morfológicos asociados con la activación de la microglía: el paso de una morfología ramificada a otra más redondeada, con menor número de ramificaciones y menor longitud de las mismas. Tanto el número de ramificaciones como la longitud de las mismas se analizaron en dos regiones del hipocampo implicadas tanto en la codificación como en el recuerdo de la memoria: el giro dentado y CA1 (Bernier et al. 2017, Ocampo et al. 2017).

Nuestros resultados muestran una activación microglial, tanto en el giro dentado (**Figura 32**) como en la región CA1 (**Figura 33**), representada en ambos casos tanto por una menor longitud de ramificaciones como por un menor número estas, indicativo de una morfología activada.

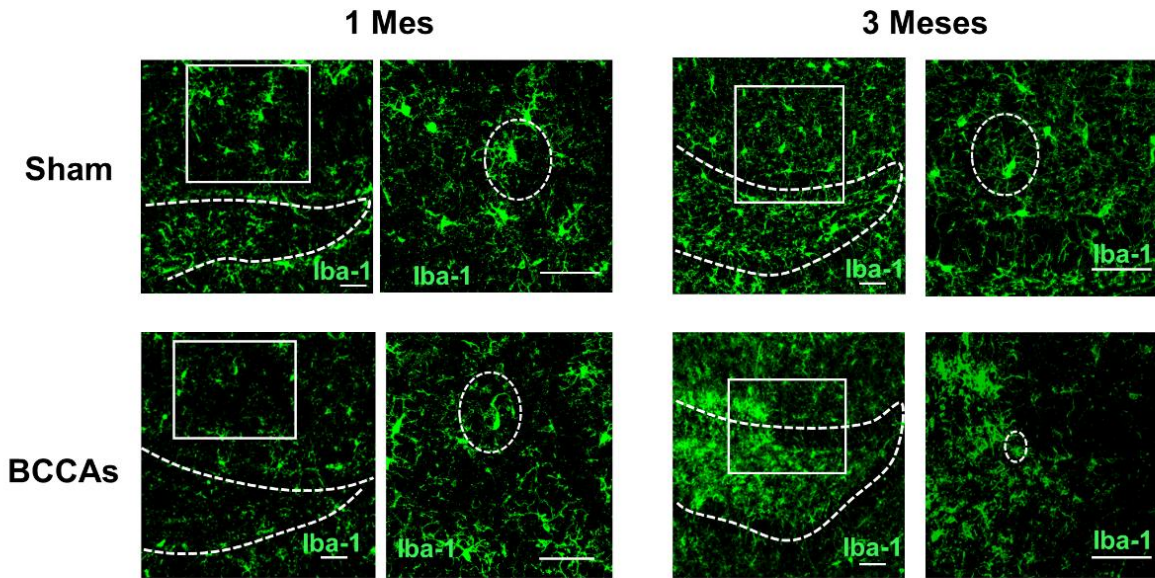
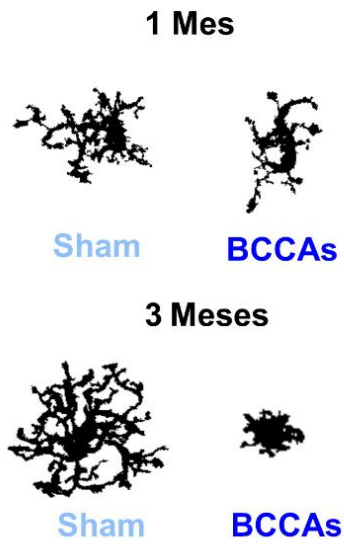
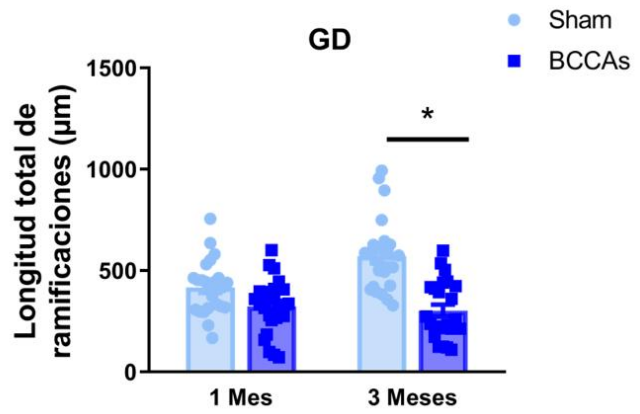
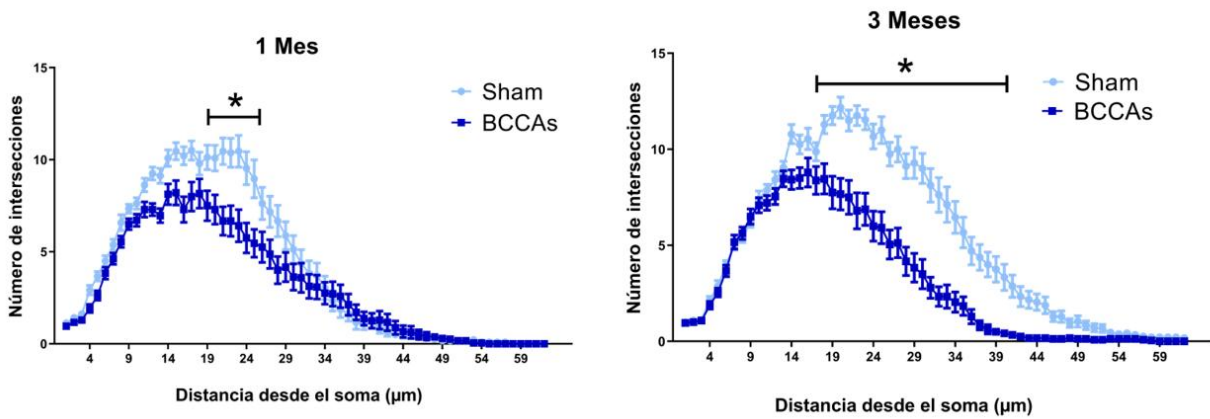
A**B****C****D**

Figura 32. Análisis morfológico de la activación microglial en el giro dentado en el modelo BCCAs. **(A)** Imágenes representativas del marcaje de Iba-1 (microglía) en animales sham y BCCAs tras 1 y 3 meses de hipoperfusión. **(B)** Reconstrucciones representativas de las células Iba-1+ obtenidas con el Plugin Simple Neurite Tracer del Software Fiji. **(C)** Análisis de la longitud de ramificaciones en el giro dentado del hipocampo en animales sham y BCCAs. **(D)** Análisis por Sholl del número de ramificaciones de las células Iba-1+ en el giro dentado del hipocampo en animales sham y BCCAs tras 1 (**izda**) y 3 (**dcha**) meses de hipoperfusión. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n=24-29 células/3 animales). Escalas = 50 micras.

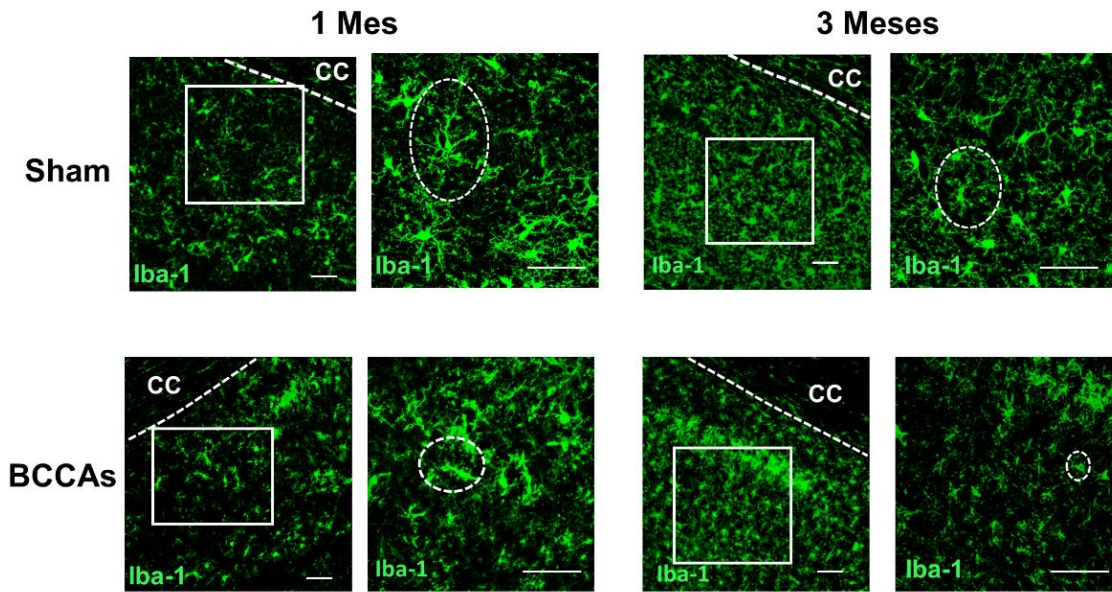
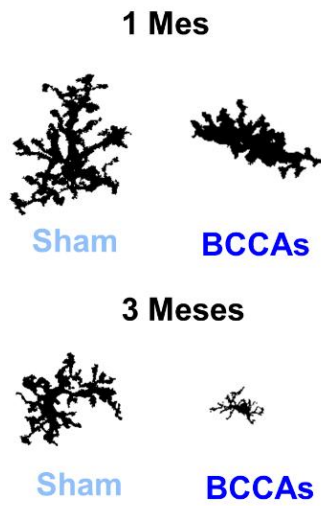
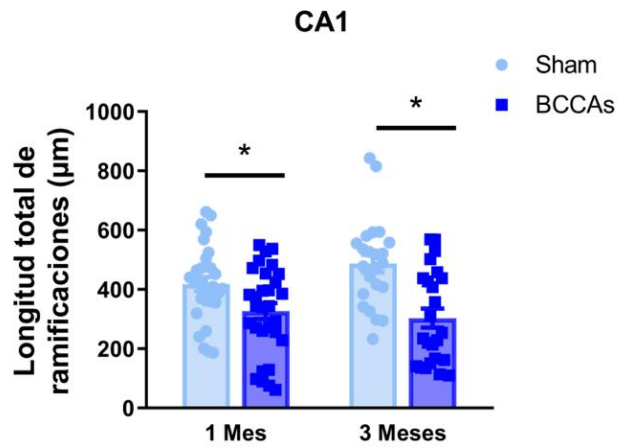
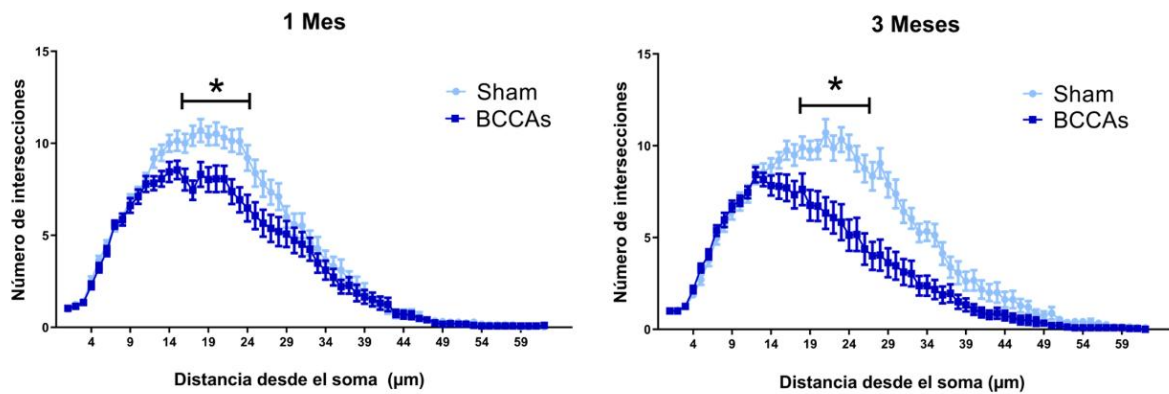
A**B****C****D**

Figura 33. Análisis morfológico de la activación microglial en la región CA1 en el modelo BCCAs. **(A)** Imágenes representativas del marcaje de Iba-1 (microglía) en animales sham y BCCAs tras 1 y 3 meses de hipoperfusión. **(B)** Reconstrucciones representativas de las células Iba-1+ obtenidas con el *Plugin Simple Neurite Tracer* del Software Fiji. **(C)** Análisis de la longitud de ramificaciones en la región CA1 del hipocampo en animales sham y BCCAs. **(D)** Análisis por *Sholl* del número de ramificaciones de las células Iba-1+ en la región CA1 del hipocampo en animales sham y BCCAs tras 1 (**izda**) y 3 (**dcha**) meses de hipoperfusión. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n=24-29 células/3 animales). Escalas = 50 micras. CC: Cuerpo caloso.

4.2.5. Alteraciones vasculares

Dados los cambios encontrados en la región hipocampal, tanto en respuesta microglial como en alteraciones neurogénicas, nos preguntamos si alguno de estos cambios podría estar mediado por alteraciones a nivel vascular y relacionadas, al menos en parte, por el descenso de flujo sanguíneo cerebral. Por ello decidimos estudiar la vascularización del giro dentado así como la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la presencia de células inmunes infiltradas en el parénquima cerebral.

Con el fin de evaluar la vascularización del giro dentado se realizó un análisis tanto de la densidad como de la morfología vascular, en el que se determinó el volumen vascular total, la densidad vascular (longitud/volumen), así como su tortuosidad (longitud/eje más largo) y su diámetro (**Figura 34**). Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los animales sham y BCCAs en ninguno de los parámetros estudiados, ni tras 1 ni tras 3 meses de hipoperfusión, lo que nos indica que, tras estos tiempos, la hipoperfusión no provoca cambios de morfología vascular en el hipocampo.

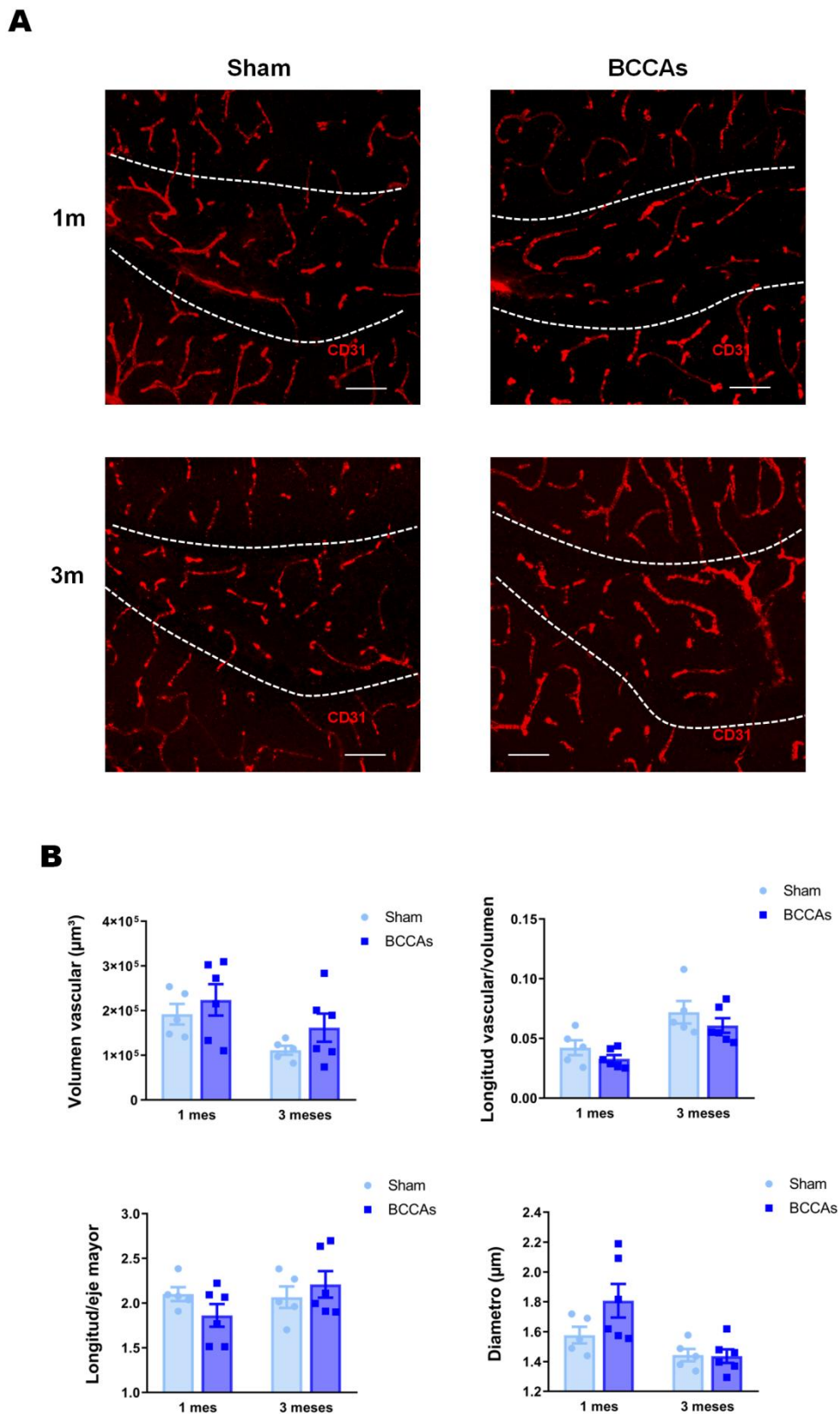


Figura 34. Evaluación de la vascularización del giro dentado en el modelo BCCAs. **(A)** Imágenes representativas de la tinción vascular mediante CD31 en animales sham y BCCAs tras 1 y 3 meses de hipoperfusión. **(B)** Análisis del volumen, la densidad, la tortuosidad y el diámetro vasculares. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n=5-6 por grupo). Escalas = 50 micras.

En segundo lugar, se pasó a determinar la existencia de alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el hipocampo, así como la presencia de células inmunes infiltradas en el parénquima. Se determinó concretamente la presencia de neutrófilos, ya que es sabido que estas células se trasvasan desde el torrente sanguíneo al parénquima cerebral en caso de daño, como ocurre tras la isquemia (Garcia-Culebras et al. 2018), así como la presencia de productos liberados por estas células e implicados en la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), elastasa e histona.

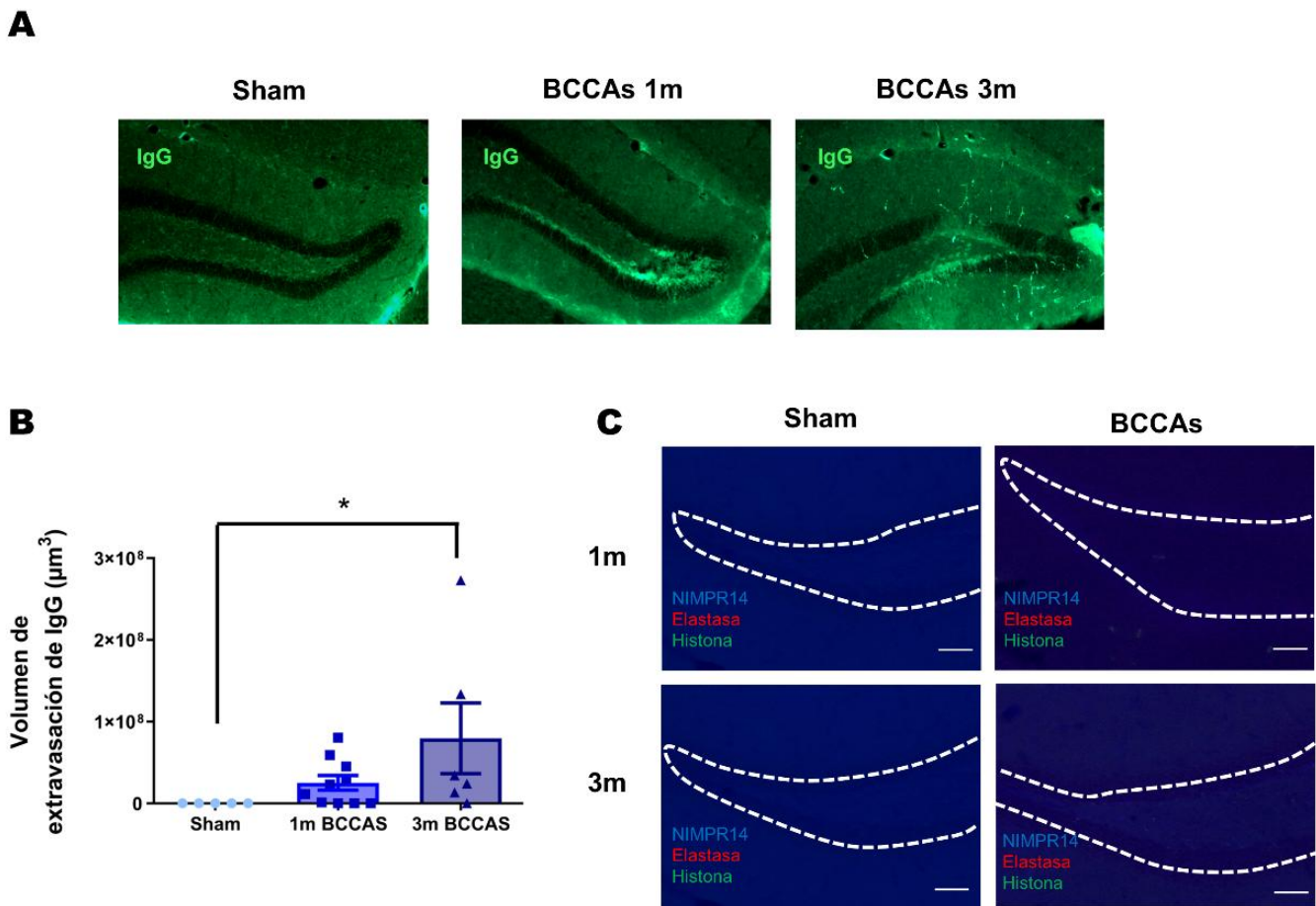


Figura 35. Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y de la presencia de células infiltradas en el parénquima en el modelo BCCAs. **(A)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de IgG obtenidas con un objetivo 10x **(B)** Cuantificación del volumen de IgG extravasado al parénquima. **(C)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia para NIMPR-14, elastasa e histona. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de una vía con post-test de Bonferroni ($n=5-10$ por grupo). Escalas 50 micras.

Los resultados muestran un incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el hipocampo en los animales BCCAs respecto a los sham que, aunque apreciable tras 1 mes de hipoperfusión, alcanza niveles de significación pasados 3 meses (**Figura 35B**). Por otro lado, a pesar del aumento de permeabilidad de la barrera no se detecta la presencia de neutrófilos NIMPR14 infiltrados en el parénquima del hipocampo en ninguno de los tiempos estudiados, ni de NETs liberados por estos (**Figura 35C**).

4.2.6. Estudio de marcadores periféricos: NETosis en plasma.

Por último, dado el creciente interés sobre el papel que juegan los NETs en la formación de fenómenos trombóticos periféricos que dan lugar a lesiones isquémicas a nivel cerebral (Ducroux et al. 2018, Zha et al. 2018), nos preguntamos si la presencia de NETs en plasma podría ser un marcador de la evolución del proceso de deterioro cognitivo en nuestro modelo de hipoperfusión, ya que una proporción de los animales BCCAs presentan lesiones isquémicas. Para ello medimos la presencia de NETs en el plasma de los animales sometidos a BCCAs mediante un ensayo ELISA (**Figura 36**). Los resultados obtenidos no muestran diferencias entre los grupos estudiados.

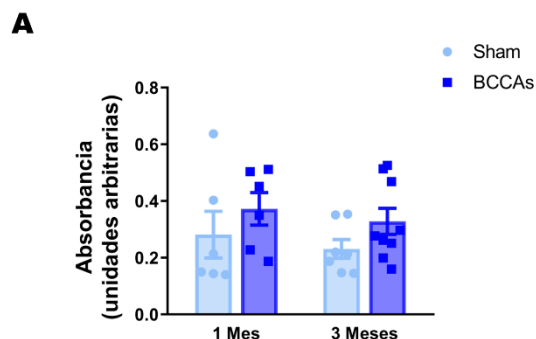


Figura 36. Cuantificación de la presencia de NETs en plasma en el modelo BCCAs mediante ensayo ELISA. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n=6-9 por grupo).

4.3. Caracterización del déficit cognitivo en el modelo HSD

Con el propósito de determinar si la dieta alta en sodio es capaz de provocar déficits cognitivos asociados al hipocampo, de manera similar a lo encontrado en el modelo BCCAs, se llevó a cabo la evaluación de la memoria dependiente de hipocampo, tanto mediante un protocolo anterógrado como retrógrado, en animales alimentados con HSD o ND.

Los resultados obtenidos muestran que, tras 5 semanas, una dieta alta en sodio provoca un déficit en memoria cuando se evalúa por medio de un protocolo retrógrado, pero no anterógrado, en comparación con una dieta normal (**Figura 37**).

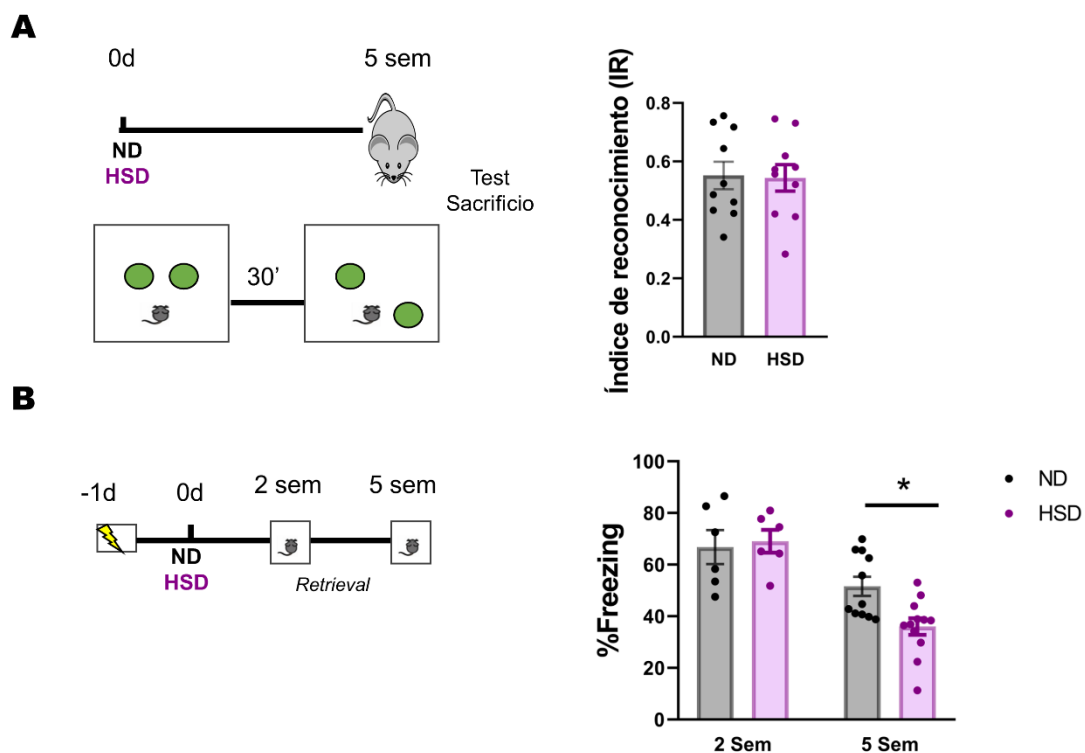


Figura 37. Evaluación del déficit cognitivo en el modelo HSD. **(A)** Evaluación de la memoria mediante un protocolo anterógrado tras 5 semanas de dieta mediante el test de nueva localización de objeto. **(B)** Evaluación de la memoria mediante un protocolo retrógrado tras 2 y 5 semanas de dieta mediante el test de condicionamiento al miedo contextual. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante T de Student (A) o ANOVA de dos vías seguido de un post test de Sidak (B) (n=6-12 por grupo, *p<0.05).

4.4. Estudio de mecanismos implicados en el deterioro cognitivo en el modelo HSD como posibles dianas terapéuticas

Una vez establecido el déficit de memoria retrógrada tras 5 semanas de dieta alta en sodio, nos propusimos estudiar efectos de dicha dieta a nivel hipocampal capaces de justificar el deterioro cognitivo observado.

4.4.1. Evaluación del daño isquémico y alteraciones anatómicas hipocampales

En primer lugar, al igual que para el modelo BCCAs, se llevó a cabo una valoración del daño isquémico hipocampal mediante el análisis cualitativo de la tinción de Nissl, clasificándose los animales entre aquellos que no presentasen un daño aparente y aquellos en los que se detectase la presencia de infartos en la formación hipocampal. Los resultados, que se resumen en la **Tabla 4**, muestran que no hay presencia de daño isquémico en los animales alimentados con la dieta HSD.

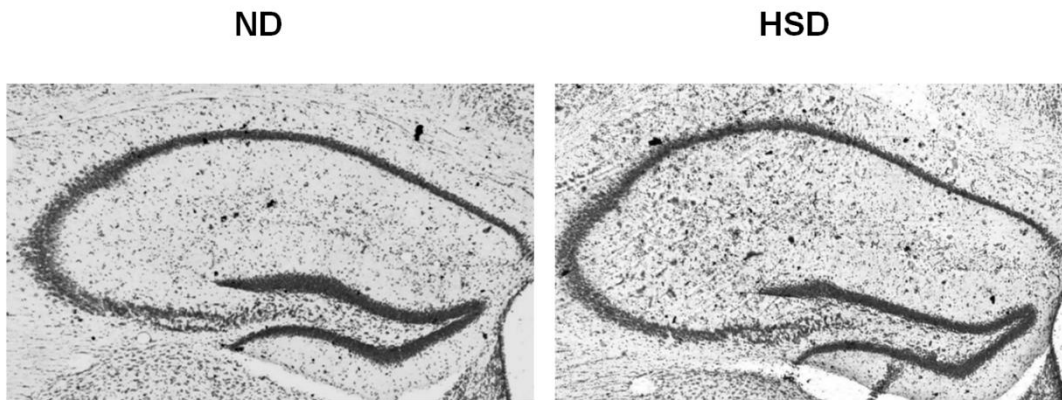
Tabla 4. Análisis cualitativo del daño isquémico en animales alimentados con una dieta HSD.

	Sin daño aparente	Micro infartos
HSD	6/6	0/6

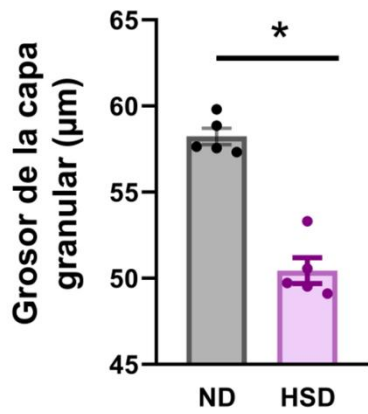
En segundo lugar, se realizó un análisis anatómico del hipocampo, mediante la medida de los volúmenes tanto del hipocampo completo como del giro dentado. Además, dada la implicación de la neurogénesis hipocampal en el deterioro cognitivo encontrada en el modelo BCCAs, se realizó la medida del grosor de la capa granular como una aproximación a una posible alteración en la neurogénesis debida a la dieta HSD.

Los resultados no muestran diferencias ni en el volumen del hipocampo ni en el del giro dentado entre animales alimentados con una dieta HSD y dieta normal (**Figura 38 C y D**). Sin embargo, sí se observa una disminución del grosor de la capa granular del giro dentado en el grupo HSD con respecto a sus controles (**Figura 38A Y B**), resultado que apunta hacia una posible implicación de la neurogénesis hipocampal en el deterioro cognitivo observado.

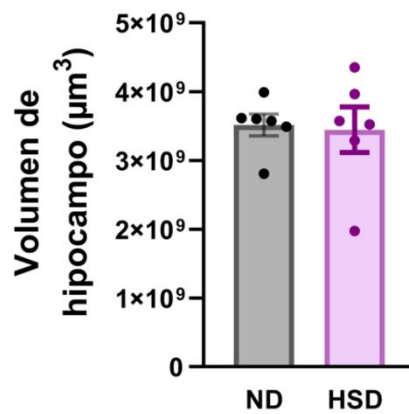
A



B



C



D

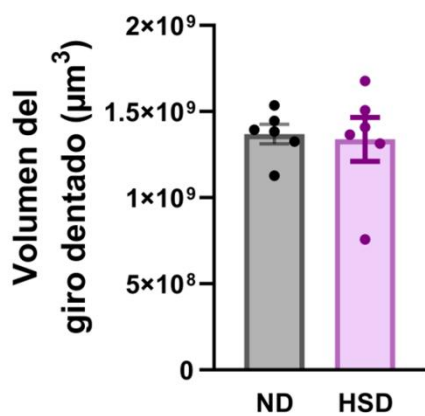


Figura 38. Evaluación de los cambios anatómicos hipocampales en el modelo HSD. Imágenes representativas (A) y cuantificación del grosor de la capa granular (B), volumen de hipocampo (C) y volumen del giro dentado (D) en animales alimentados con dieta normal y HSD. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante T de Student (n=6 por grupo).

4.4.2. Caracterización de la neurogénesis hipocampal en el modelo HSD

Dado que las alteraciones neurogénicas pueden afectar al tamaño de la CG del GD (Cancino et al. 2013) y a la importancia de la neurogénesis hipocampal en los procesos de memoria, se procedió a estudiar si la dieta alta en sodio provoca cambios en la respuesta neurogénica que pudieran estar implicados en el deterioro cognitivo. Para ello, se analizaron los diferentes estadios de maduración de las células madre neurales a lo largo de la cascada neurogénica, desde los progenitores hasta los neuroblastos.

En primer lugar, la dieta HSD produjo un descenso del número de nuevas neuronas inmaduras (células DCX+) tras 5 semanas, diferencia que no se observa en tiempos más tempranos (**Figura 39**).

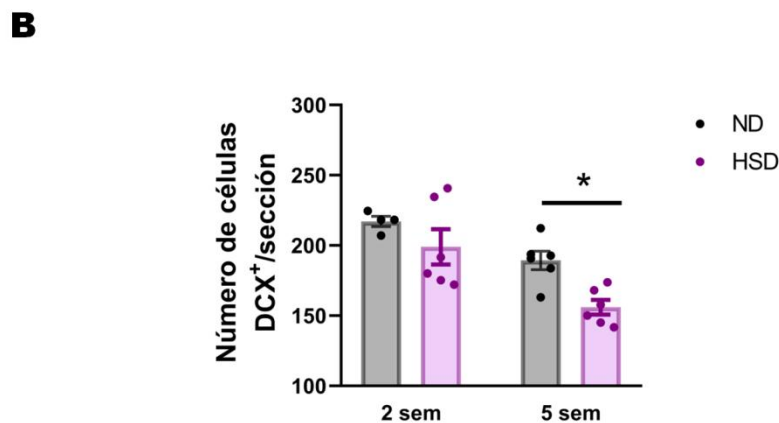
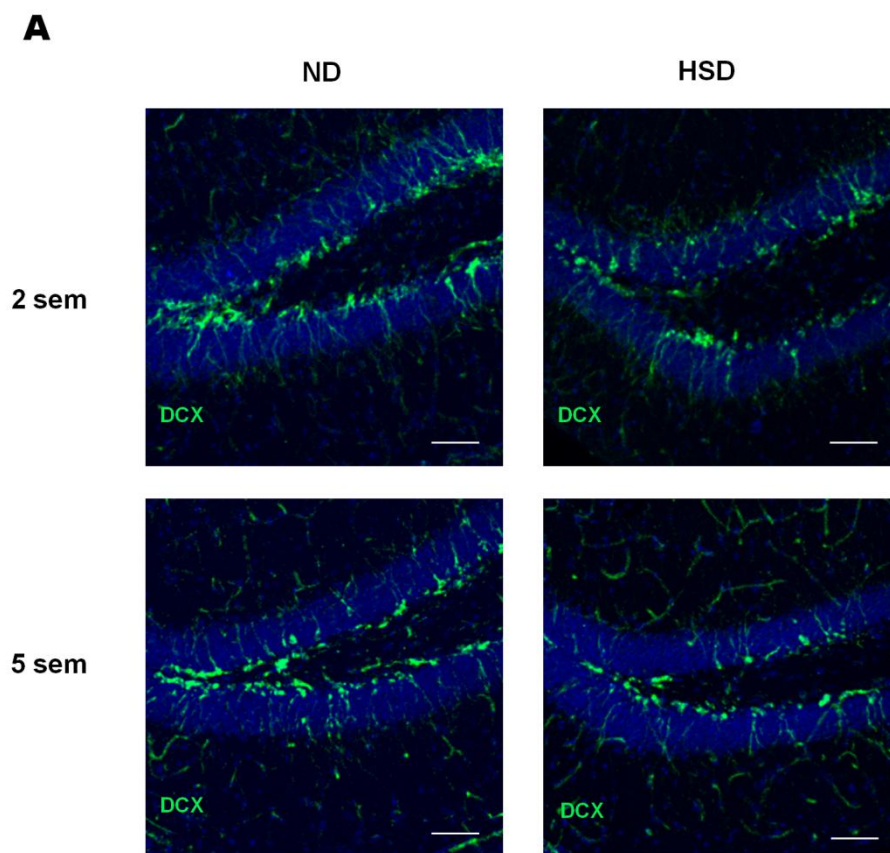


Figura 39. Estudio de la neurogénesis hipocampal en el modelo HSD. **(A)** Imágenes representativas de las células DCX+ en los grupos HD y HSD tras 2 y 5 semanas de dieta. **(B)** Cuantificación del número de neuronas inmaduras DCX+ en animales con dieta ND y HSD tras 2 y 5 semanas. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post test de Sidak (n=4-6 por grupo).

En segundo lugar, al analizar los diferentes tipos de progenitores, encontramos un aumento de las NPCs tipo 1 proliferativas tras 5 semanas de dieta HSD, así como una fuerte tendencia hacia un aumento de las NPCs tipo 1. Estas diferencias, sin embargo, no se encuentran en las NPCs tipo 2, tanto en estado quiescente como en estado proliferativo (**Figura 40**).

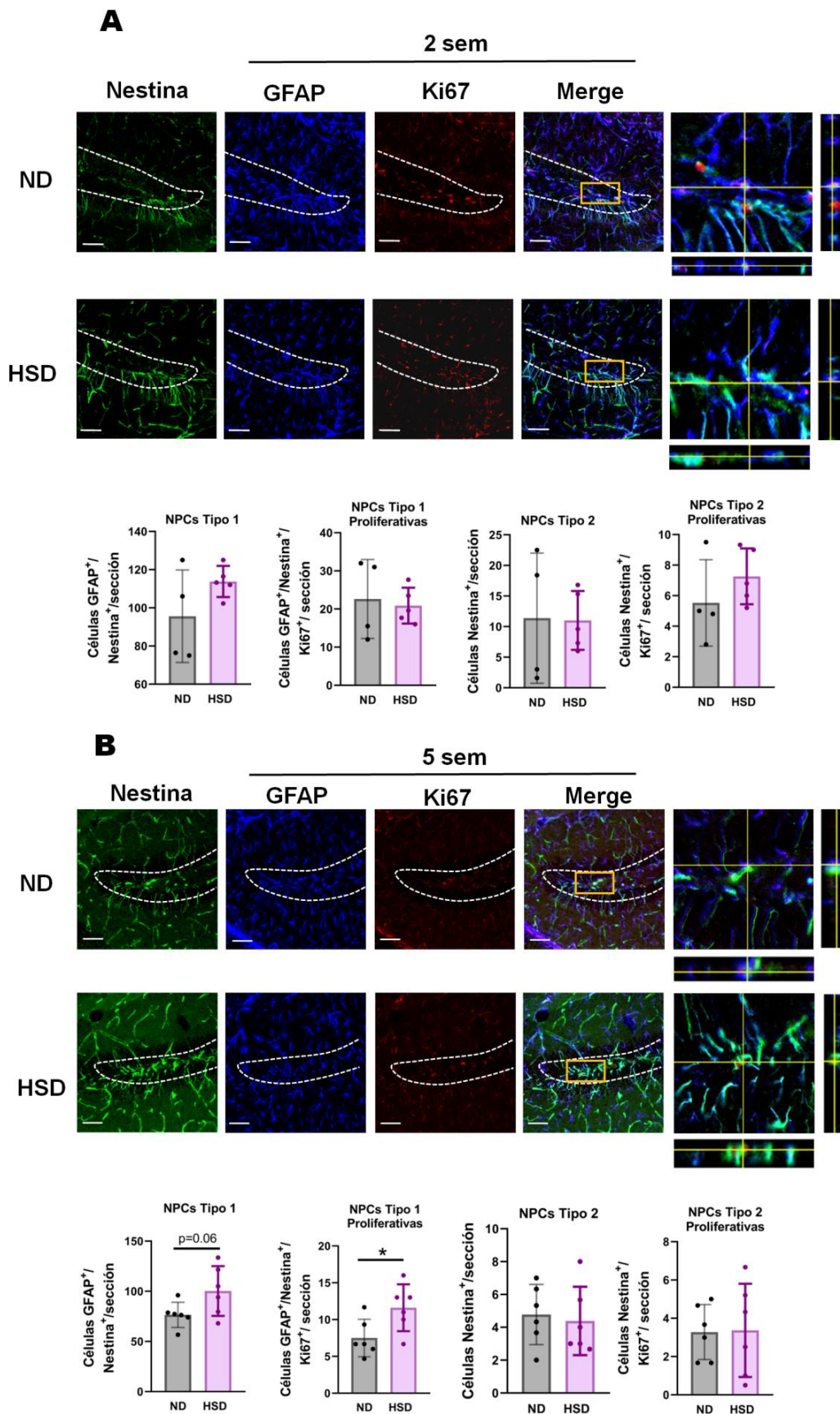


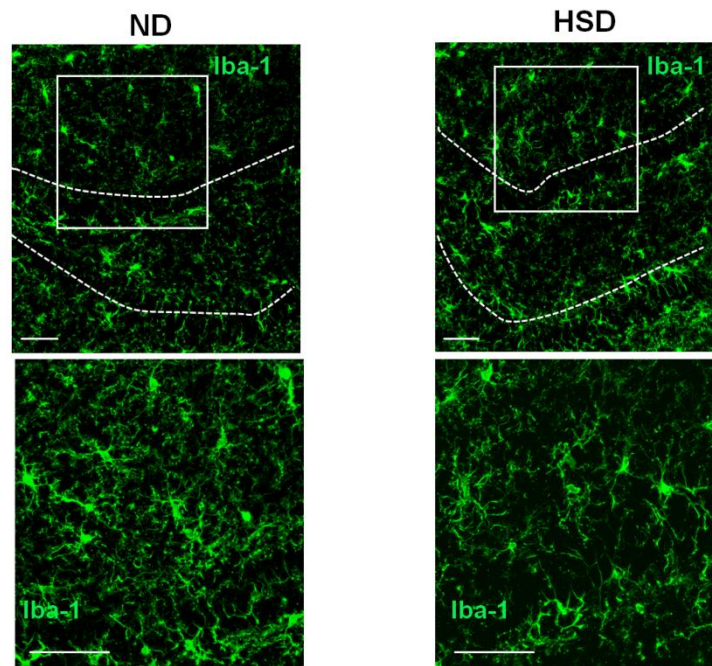
Figura 40. Análisis del nicho de progenitores neurales en el modelo HSD tras 2 (A) y 5 (B) semanas de dieta. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante t-Student (n=4-6 por grupo)

4.4.3. Alteraciones neuroinflamatorias: respuesta microglial en el hipocampo

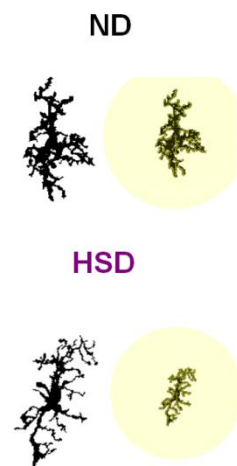
La respuesta neuroinflamatoria puede regular el proceso de neurogénesis, siendo las células de microglía las primeras en responder ante estímulos inflamatorios o cambios en el medio extracelular. Por esta razón, y debido a la implicación de estas células en la mayoría de las enfermedades asociadas a deterioro cognitivo, nos preguntamos si la microglía podría estar mediando una respuesta inflamatoria en el hipocampo debida a la dieta HSD, por lo que decidimos estudiar el estado de activación de estas células en dos regiones del hipocampo directamente implicadas tanto en la formación de la memoria como en el recuerdo: el giro dentado y el área CA1.

Para determinar el estado de activación de la microglía se realizó un análisis morfológico en el cual se obtuvo la longitud total de las ramificaciones de las células microgliales, así como el número de ramificaciones en función a su distancia al soma por medio de un análisis Sholl. En ambos parámetros observamos una disminución tras 5 semanas de dieta en los animales HSD, lo que nos indica que las células microgliales presentan una morfología correspondiente a un estado más activado en los animales HSD con respecto a sus controles ND, tanto en el giro dentado (**Figura 41**) como en la región CA1 (**Figura 42**).

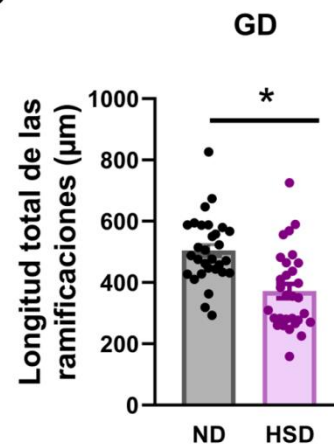
A



B



C



D

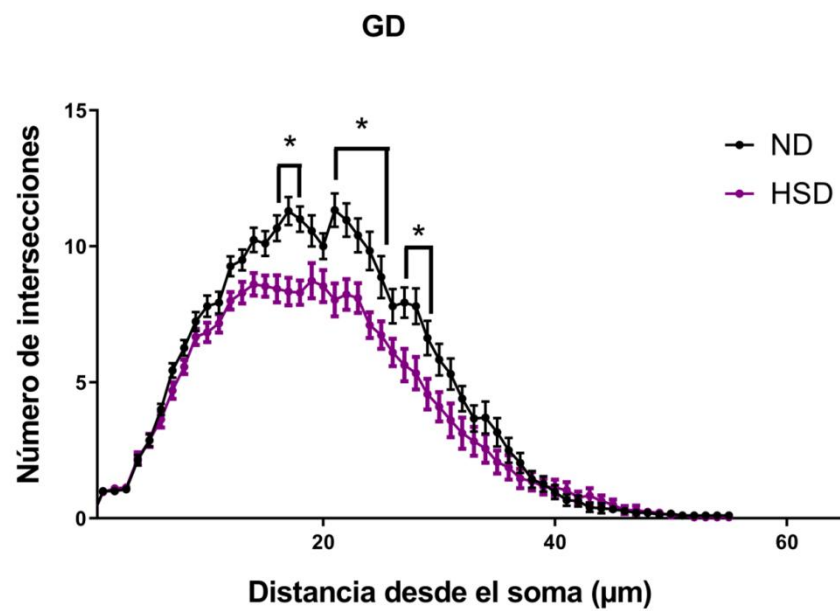
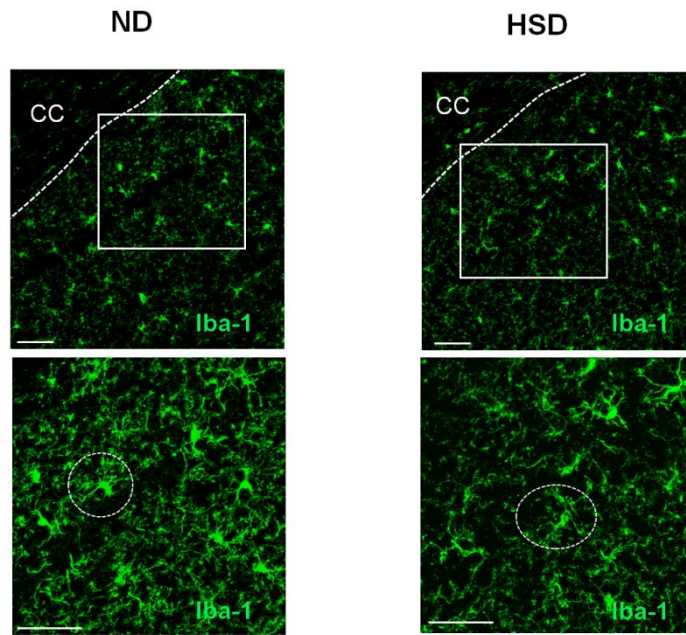
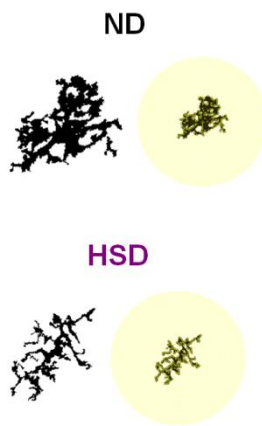


Figura 41. Análisis morfológico de la activación microglial en el GD en el modelo HSD. **(A)** Imágenes representativas del marcaje de Iba-1 en animales ND y HSD tras 5 semanas de dieta. **(B)** Reconstrucciones representativas de las células Iba-1+ obtenidas con el Plugin Simple Neurite Tracer del Software Fiji. **(C)** Análisis de la longitud de ramificaciones en el GD en animales ND y HSD **(D)** Análisis por Sholl del número de ramificaciones de las células Iba-1+ en el GD en animales ND y HSD tras 5 semanas de dieta. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante T de Student (C) y ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (D) (n=30 células/3 animales). Escalas = 50 micras.

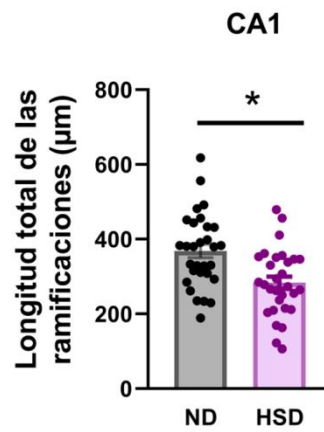
A



B



C



D

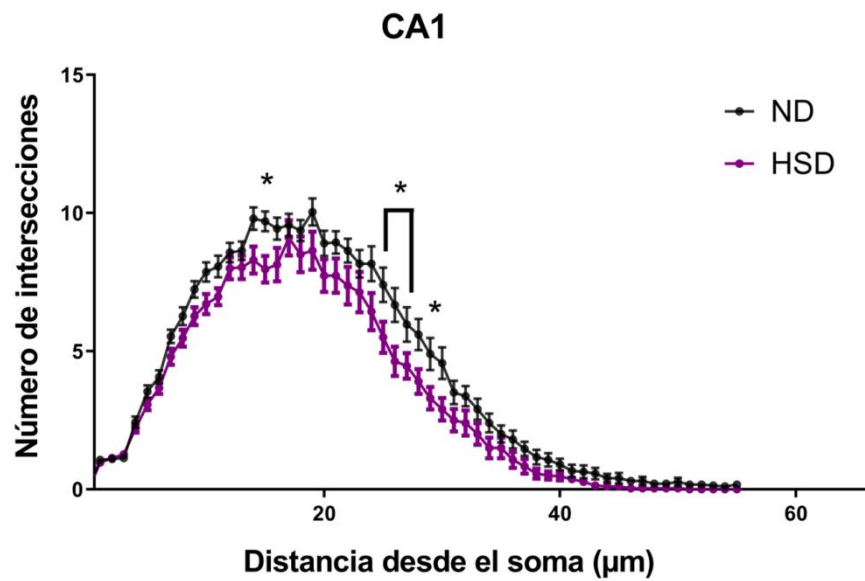


Figura 42. Análisis morfológico de la activación microglial en la región CA1 en el modelo HSD. **(A)** Imágenes representativas del marcaje de Iba-1 en animales ND y HSD tras 5 semanas de dieta. **(B)** Reconstrucciones representativas de las células Iba-1+ obtenidas con el Plugin Simple Neurite Tracer del Software Fiji. **(C)** Análisis de la longitud de ramificaciones en la región CA1 del hipocampo en animales ND y HSD **(D)** Análisis por Sholl del número de ramificaciones de las células Iba-1+ en la región CA1 del hipocampo en animales ND y HSD tras 5 semanas de dieta. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante T de Student (C) y ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (D) (n=30 células/3 animales). Escalas = 50 micras. CC: Cuerpo calloso

4.4.4. Alteraciones vasculares

Dado que los efectos a nivel cerebral de la dieta tienen lugar a través del eje intestino-cerebro, nos preguntamos si la dieta alta en sodio podría estar afectando a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, permitiendo el paso de sustancias al parénquima cerebral que puedan servir de estímulo inflamatorio a la microglía, así como a la infiltración en el parénquima de células sanguíneas, como los neutrófilos, generalmente presentes en fenómenos de isquemia (García-Culebras et al. 2018). Para ello, decidimos estudiar la permeabilidad de la BHE, por medio de la medida del volumen de IgG extravasada al parénquima del hipocampo, así como la presencia de neutrófilos y NETs por medio de los marcadores NIMPR14, elastasa e histona.

Con respecto a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, a pesar de que podemos observar una tendencia hacia una mayor permeabilidad en los animales alimentados con HSD durante 5 semanas con respecto a sus controles ND (**Figura 43 A,B**), las diferencias no alcanzan significación estadística, por lo que la dieta HSD no parece afectar a la permeabilidad de la BHE en el tiempo estudiado. Por otro lado, tampoco se observa la presencia de neutrófilos infiltrados en el parénquima del hipocampo tras 5 semanas de HSD (**Figura 43C**).

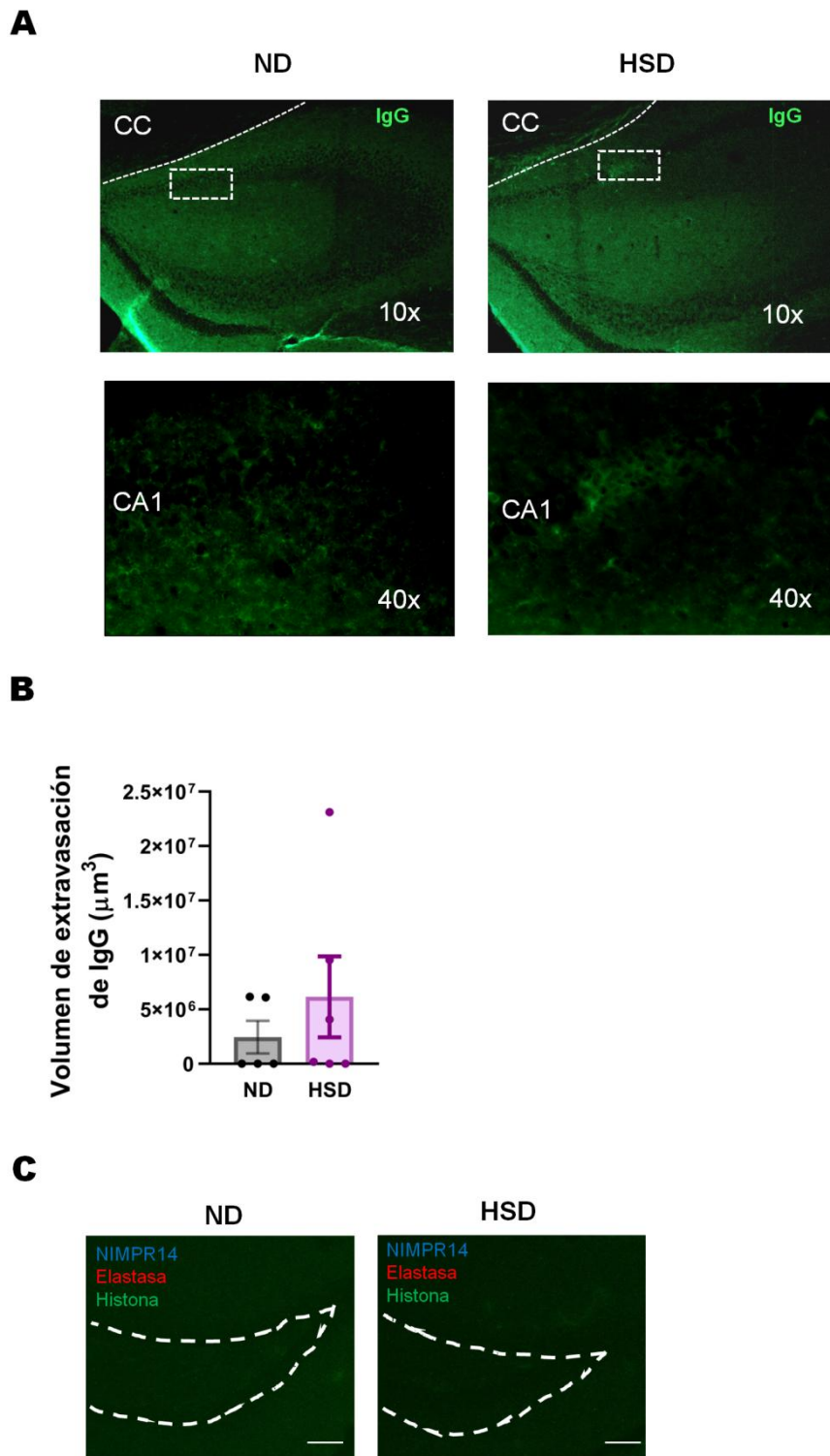


Figura 43. Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y de la presencia de células infiltradas en el parénquima tras 5 semanas de HSD **(A)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de IgG en el hipocampo completo (superior) y en detalle de la región CA1 (inferior) **(B)** Cuantificación del volumen de IgG extravasado al parénquima. **(C)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia para NIMPR-14, elastasa e histona. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante test de Mann Whitney (n=5-6 por grupo). Escalas = 50 micras.

4.4.5. Marcadores periféricos: tensión arterial y niveles plasmáticos de Na⁺

Los efectos de una dieta alta en sodio generalmente se han asociado a un incremento de la presión arterial, utilizándose incluso la dieta como modelo de hipertensión en algunas especies animales (Sarikonda et al. 2009). Ya que la hipertensión desencadena una serie de mecanismos a nivel vascular que podrían contribuir al deterioro cognitivo, realizamos la medida de la presión arterial en los animales tras 5 semanas de HSD. Del mismo modo, nos preguntamos si los niveles de sodio en sangre podrían estar mediando de algún modo las alteraciones observadas, ya que la hipernatremia puede desencadenar alteraciones neurológicas (Reynolds et al. 2006), por lo que obtuvimos los valores de los niveles plasmáticos de Na⁺ tras 5 semanas de HSD.

Los resultados no muestran diferencias ni en cuanto a la presión arterial ni en los niveles plasmáticos de Na⁺ tras 5 semanas de dieta, por lo que ni el déficit cognitivo ni el resto de las alteraciones observadas a nivel cerebral parecen ser debidas a hipertensión o a cambios en los niveles de Na⁺ plasmáticos (**Figura 44**).

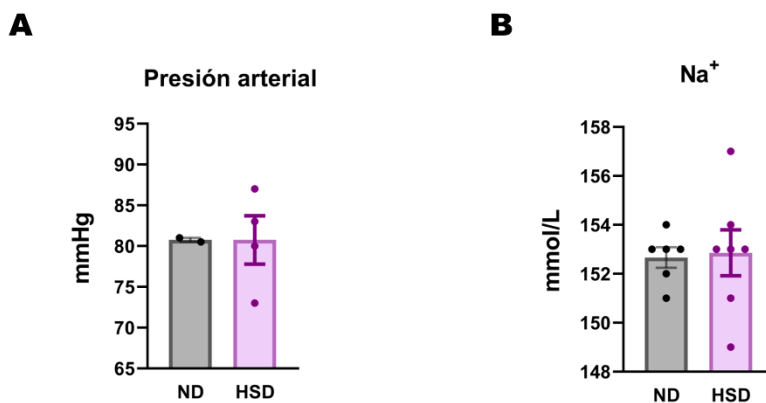


Figura 44. Medida de la presión arterial (**A**) y de los niveles plasmáticos de Na⁺ (**B**) en animales alimentados con dieta ND y HSD durante 5 semanas. Datos representados como media ± SEM y analizados mediante T-Student (n= 2-4 (A), n=6-7 (B) por grupo).

4.4.6. Estudio de la reversibilidad del déficit tras regreso a dieta normal

4.4.6.1. Déficit cognitivo

El cambio de patrones alimenticios de la población es uno de los retos de las organizaciones sanitarias, puesto que podría suponer una herramienta para reducir la patogenicidad de la HSD, persiguiéndose el objetivo de que los aportes dietéticos de los diferentes nutrientes se ajusten al rango de valores recomendados. Al ser el consumo de sodio una variable fácilmente modificable dentro de la dieta, nos preguntamos si el déficit cognitivo y las alteraciones en el nicho neurogénico observadas tras 5 semanas de dieta HSD serían reversibles si, pasado este tiempo, los animales son devueltos a una dieta normal. Con ese objetivo, realizamos el test de condicionamiento al miedo contextual tras 5 semanas de dieta ND o HSD, tiempo tras el cual los animales HSD fueron devueltos a una dieta normal (HSD-ND), mientras que los controles mantuvieron una dieta normal durante las 10 semanas totales (ND-ND). De esta forma, evaluamos si el efecto de la dieta sobre un recuerdo anterior (protocolo retrógrado) es reversible al reducir el consumo de sodio. Los resultados muestran una disminución en el tiempo de *freezing* de los animales HSD en respuesta al miedo cuando se comparan con los controles ND, tanto tras las 5 semanas de dieta HSD, como ya vimos previamente, como tras 10 semanas en los animales HSD-ND (**Figura 45**). Esto nos indica que el efecto de la dieta HSD sobre la memoria, evaluada mediante un protocolo retrógrado, no es reversible con el regreso a una dieta ND.

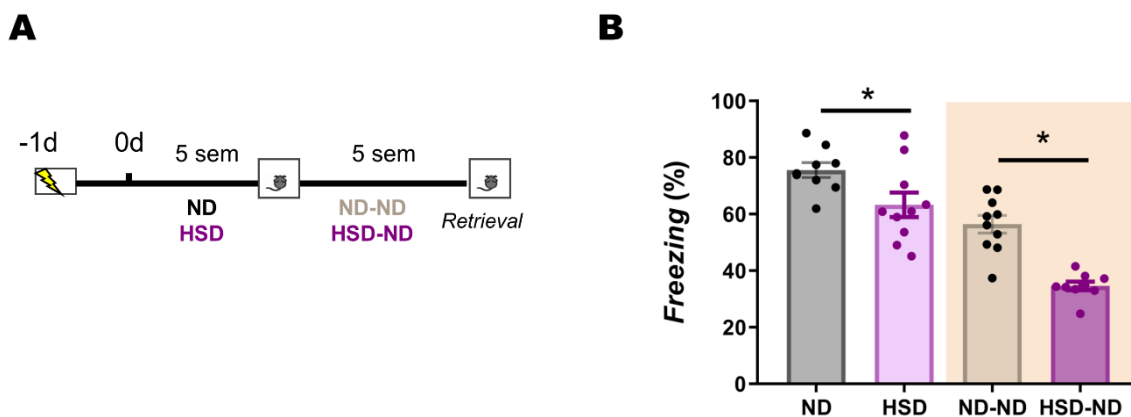


Figura 45. Estudio de la reversibilidad del déficit cognitivo tras regreso a una dieta normal. **(A)** Protocolo retrógrado para la realización del test de condicionamiento al miedo contextual. **(B)** Cuantificación de la respuesta de *freezing* de los animales tras 5 semanas de dieta ND/HSD y tras otras 5 semanas con mantenimiento o regreso a dieta normal (ND-ND/HSD-ND). Datos representados como media ± SEM y analizados mediante ANOVA de una vía seguido de un post test de Sidak (n= 9-10 por grupo).

4.4.6.2. Neurogénesis hipocampal

Además del estudio de la reversibilidad del déficit de memoria , decidimos comprobar si el regreso a una dieta normal tiene algún efecto sobre las alteraciones observadas en la neurogénesis hipocampal. Para ello analizamos tanto las nuevas neuronas inmaduras DCX⁺ como los progenitores neurales nestina⁺/GFAP⁺ y nestina⁺/GFAP⁻. En ambos casos encontramos que las alteraciones provocadas por la dieta HSD son revertidas tras el regreso a una dieta normal (**Figura 46**) y (**Figura 47**).

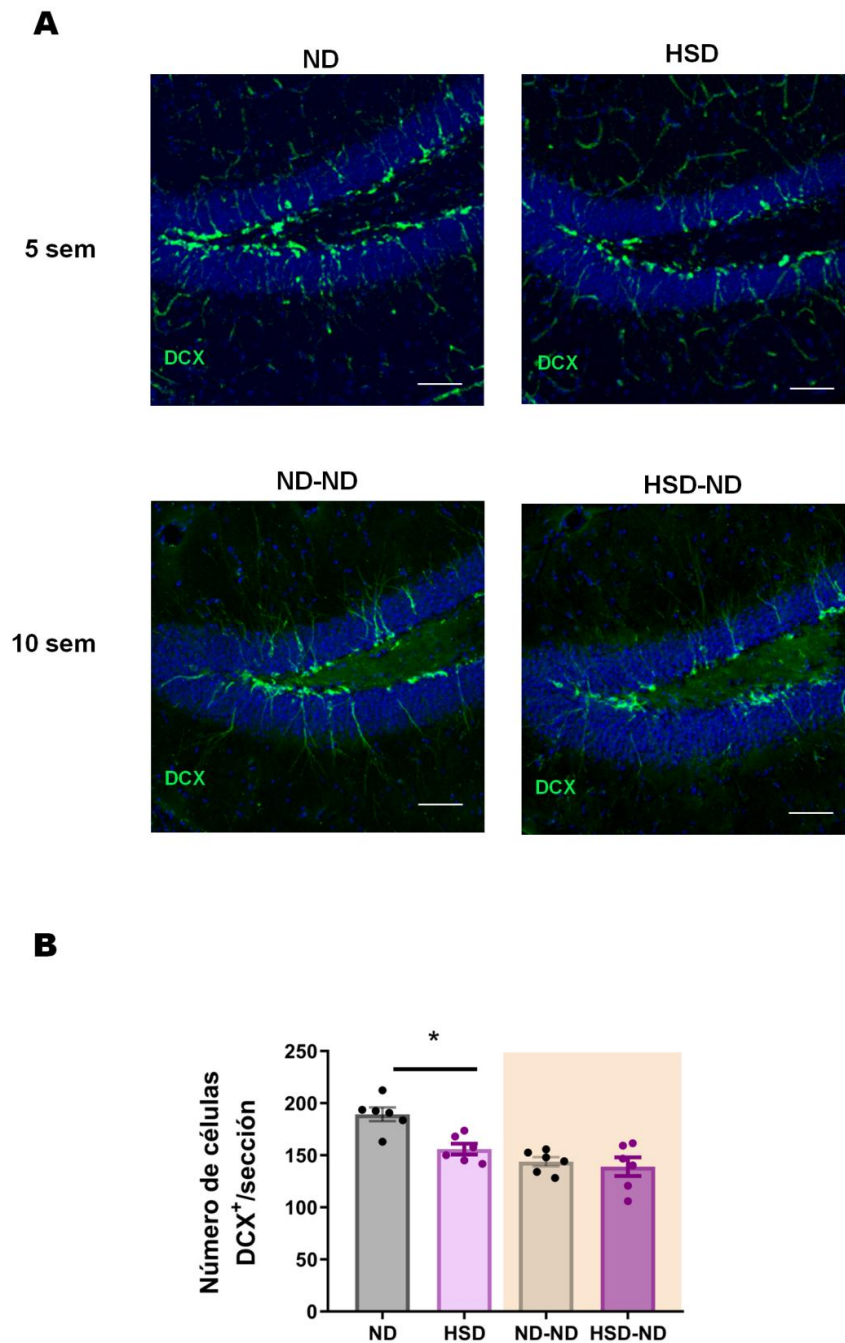


Figura 46. Análisis de las nuevas neuronas DCX+ tras regreso a una dieta normal **(A)** Imágenes representativas de las neuronas DCX+ tras 5 semanas de ND o HSD y tras 10 semanas con regreso a dieta normal (ND-ND, HSD-ND) **(B)** Análisis del número de células DCX+/sección. Datos representados como media ± SEM y analizados mediante ANOVA de una vía seguido de un post test de Sidak (n= 6 por grupo).

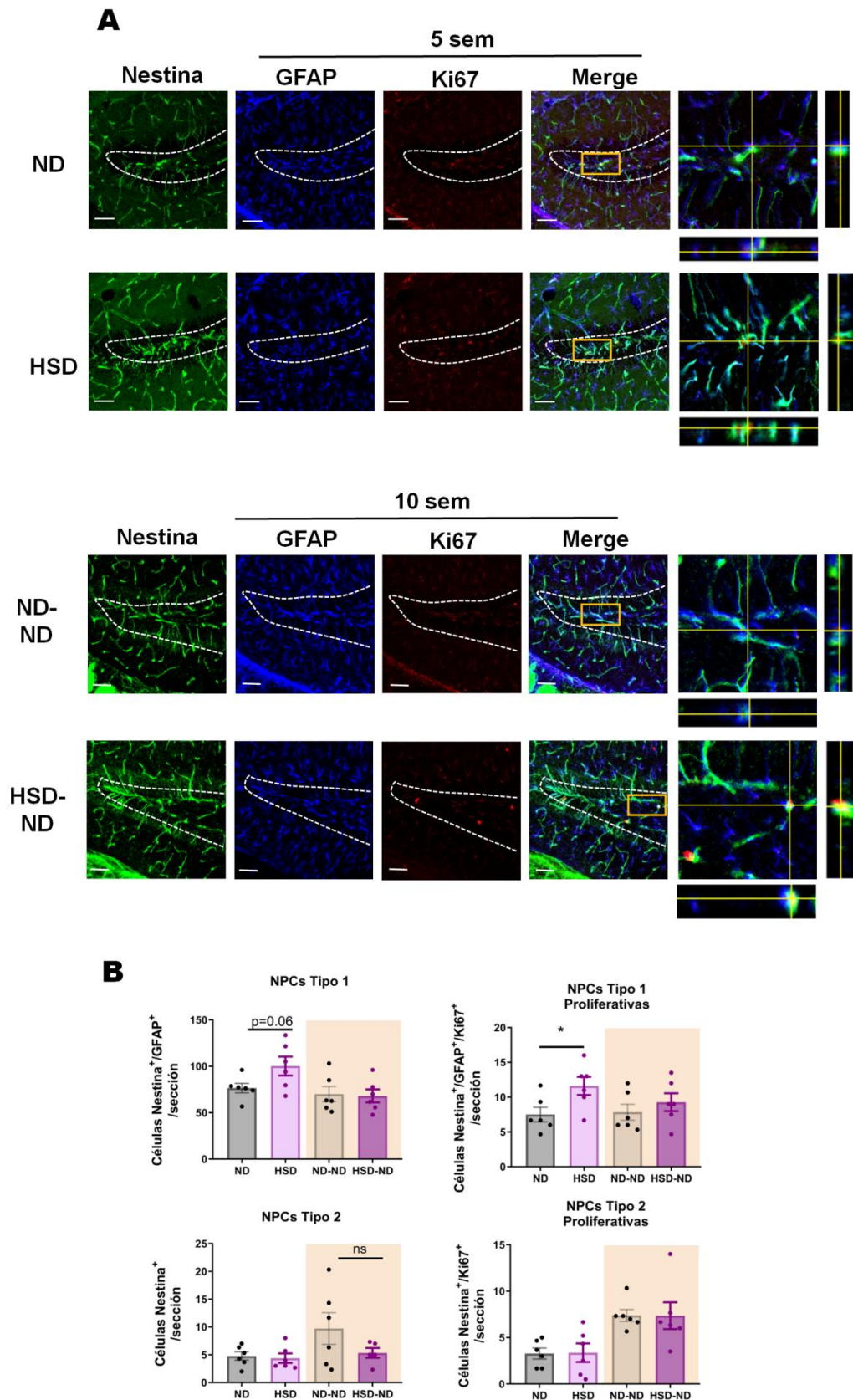


Figura 47. Análisis del nicho de progenitores neurales tras regreso a ND **(A)** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de nestina/GFAP/Ki67 tras 5 semanas de dieta (superior) y 10 semanas con regreso a ND (inferior) **(B)** Análisis del número de células progenitoras tipo 1 y tipo 2 quiescentes (izda) y proliferativas (dcha). Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de una vía con post test de Sidak (n=4-6 por grupo).

4.5. Estudio del papel del receptor TLR4 en el modelo HSD

Dado que las alteraciones provocadas por una dieta alta en sodio observadas en esta tesis doctoral se enmarcan dentro del contexto tanto de la inflamación como de la neurogénesis, postulamos al receptor TLR4 como una posible diana que pudiera estar participando en la respuesta a una dieta alta en sodio. Por ello decidimos evaluar la implicación de TLR4 en las alteraciones observadas en el modelo HSD.

4.5.1. Evaluación del déficit cognitivo asociado al modelo HSD en ratones TLR4^{-/-}

En primer lugar, decidimos comprobar si el déficit cognitivo observado en el modelo HSD se desarrollaba también en ausencia del receptor TLR4. Para ello, se evaluó la memoria mediante un protocolo retrógrado en animales deficientes para TLR4 (TLR4^{-/-}) alimentados durante 5 semanas con una dieta ND o HSD mediante el test de condicionamiento al miedo contextual.

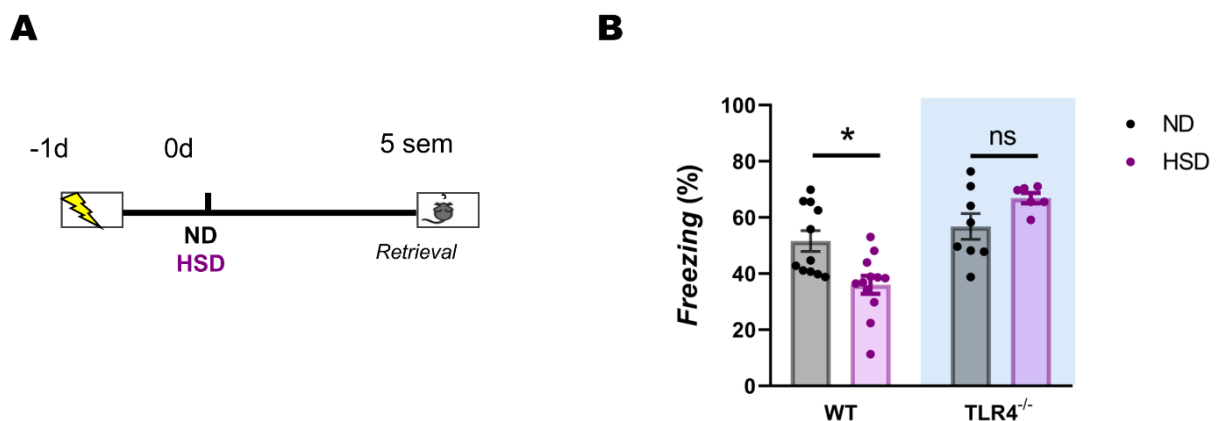


Figura 48. Evaluación del déficit cognitivo asociado al modelo HSD en animales TLR4^{-/-} (A) Protocolo retrógrado de evaluación de la memoria mediante el test de *contextual fear conditioning*. (B) Cuantificación de la respuesta de *freezing* de los animales WT y TLR4^{-/-} tras 5 semanas de ND/HSD. Datos representados como media ± SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías seguido de un post test de Bonferroni (n= 7-12 por grupo).

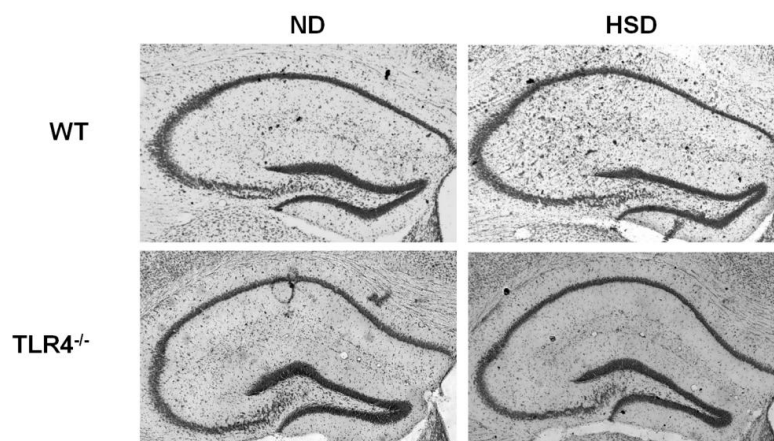
Los resultados muestran que la disminución en la respuesta de *freezing* observada en los animales WT tras 5 semanas de HSD no ocurre en los animales carentes de TLR4 (Figura 48), lo que apoya la implicación del receptor TLR4 en el deterioro cognitivo asociado a la dieta HSD.

4.5.2. Evaluación de las alteraciones hipocampales asociadas al modelo HSD en ratones TLR4^{-/-}

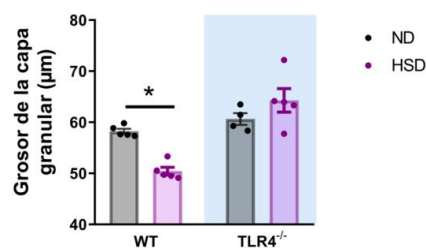
Una vez comprobado que los animales TLR4^{-/-} no desarrollan el déficit cognitivo asociado a la dieta HSD a diferencia de lo que ocurre en los animales WT, decidimos estudiar en qué proceso podría estar implicado el receptor TLR4. En primer lugar, evaluamos la aparición de las alteraciones anatómicas a nivel hipocampal observadas en los animales WT, mediante la medida del volumen total del hipocampo, del giro dentado así como el grosor de la capa granular.

Los resultados muestran que la disminución de grosor en la capa granular que presentan los animales WT tras 5 semanas de dieta HSD no ocurre en los animales TLR4^{-/-} tras el mismo periodo de dieta (**Figura 49B**), lo que nos indica que la dieta HSD no tiene el mismo efecto a nivel hipocampal en los animales WT que en los carentes del receptor TLR4. Por su parte, los volúmenes tanto de hipocampo como del giro dentado se mantienen constantes en ambos grupos (**Figura 49C,D**).

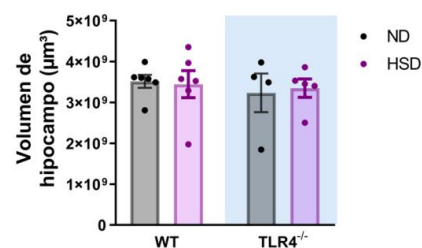
A



B



C



D

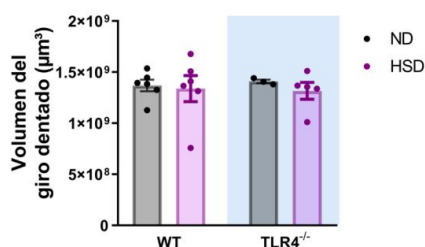
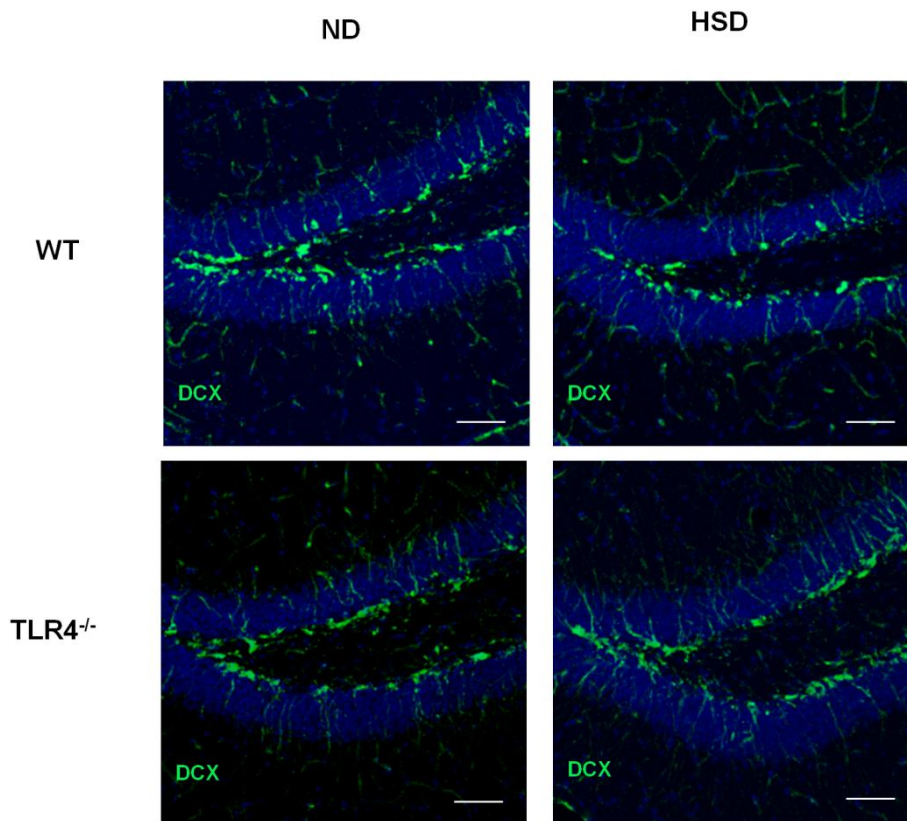


Figura 49. Evaluación de los cambios anatómicos hipocampales asociados al modelo HSD en animales TLR4^{-/-}. Imágenes representativas (A) y cuantificación del grosor de la capa granular (B), volumen de hipocampo (C) y volumen del giro dentado (D) en animales WT y TLR4^{-/-} alimentados con dieta normal y HSD. Datos representados como media ± SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Sidak (n=4-6 por grupo).

4.5.3. Caracterización de la neurogénesis hipocampal en animales TLR4^{-/-}

Dada la relación existente entre el tamaño de la capa granular del GD y la neurogénesis hipocampal (Cancino et al. 2013), el siguiente paso consistió en comprobar el efecto de la dieta HSD en el número de nuevas neuronas DCX+ en el GD. Los resultados muestran cómo, al igual que ocurre con el déficit de memoria y el grosor de la capa granular, el número de nuevas neuronas inmaduras (DCX+) en el giro dentado en los animales TLR4^{-/-} no se ve alterado tras 5 semanas de dieta HSD, como sí ocurre en los animales WT (**Figura 50**).

A



B

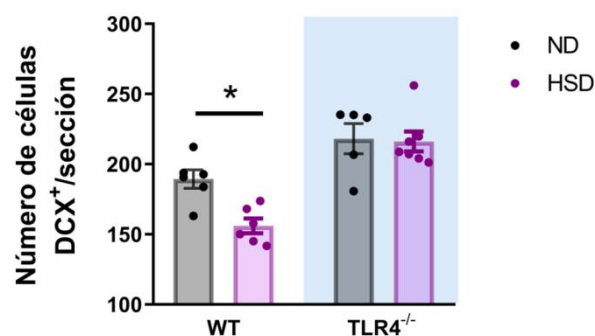
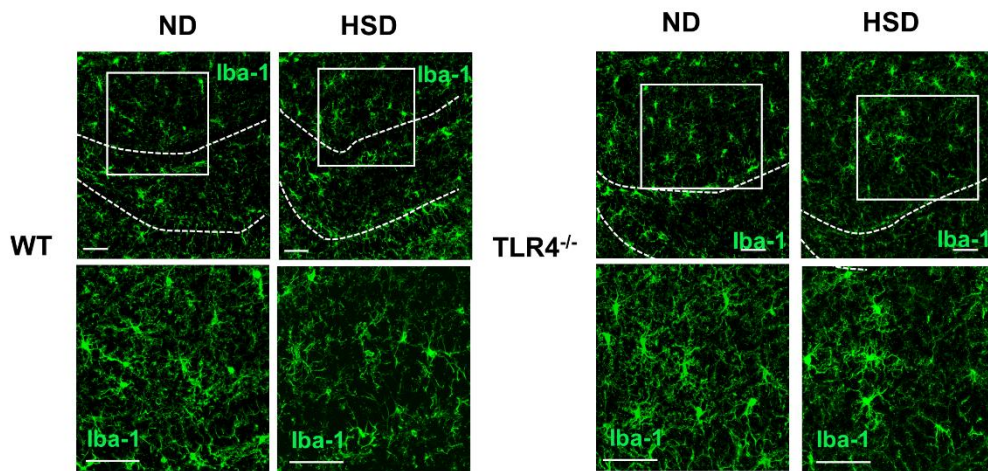


Figura 50. Estudio de la neurogénesis hipocámpal tras 5 semanas de dieta HSD en animales WT y $TLR4^{-/-}$. **(A)** Imágenes representativas de las células DCX+ tras 5 semanas de dieta. **(B)** Cuantificación del número de neuronas inmaduras DCX+ en animales WT y $TLR4^{-/-}$ alimentados con dieta ND y HSD durante 5 semanas. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni (n=5-6 por grupo). Escalas = 50 micras.

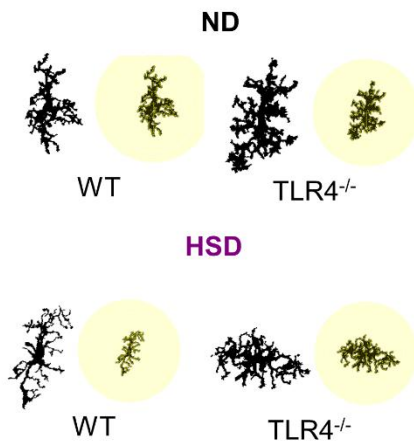
4.5.4. Alteraciones neuroinflamatorias: respuesta microglial en el hipocampo en animales $TLR4^{-/-}$

Ya que los resultados obtenidos hasta el momento indican que tanto las alteraciones de la neurogénesis hipocámpal, como el déficit de memoria observados en animales WT tras 5 semanas de dieta HSD no se presentan en animales $TLR4^{-/-}$, nos preguntamos si este efecto podría ser debido a una distinta respuesta microglial en el hipocampo en los animales carentes de TLR4, dado el papel de este receptor en la activación de la microglía. Por ello, al igual que para los animales WT, realizamos un análisis morfológico del estado de activación de la microglía tras 5 semanas de dieta en animales $TLR4^{-/-}$, determinándose la longitud total de las ramificaciones de las células microgliales, así como el número de ramificaciones en función a su distancia al soma por medio de un análisis *Sholl*, tanto en el GD como en CA1. Los resultados muestran que, en ambas regiones estudiadas, la activación microglial en los animales $TLR4^{-/-}$ es menor que lo observado en los animales WT en respuesta a la dieta HSD (**Figura 51**) y (**Figura 52**).

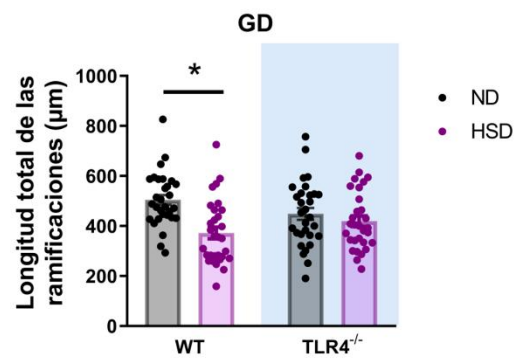
A



B



C



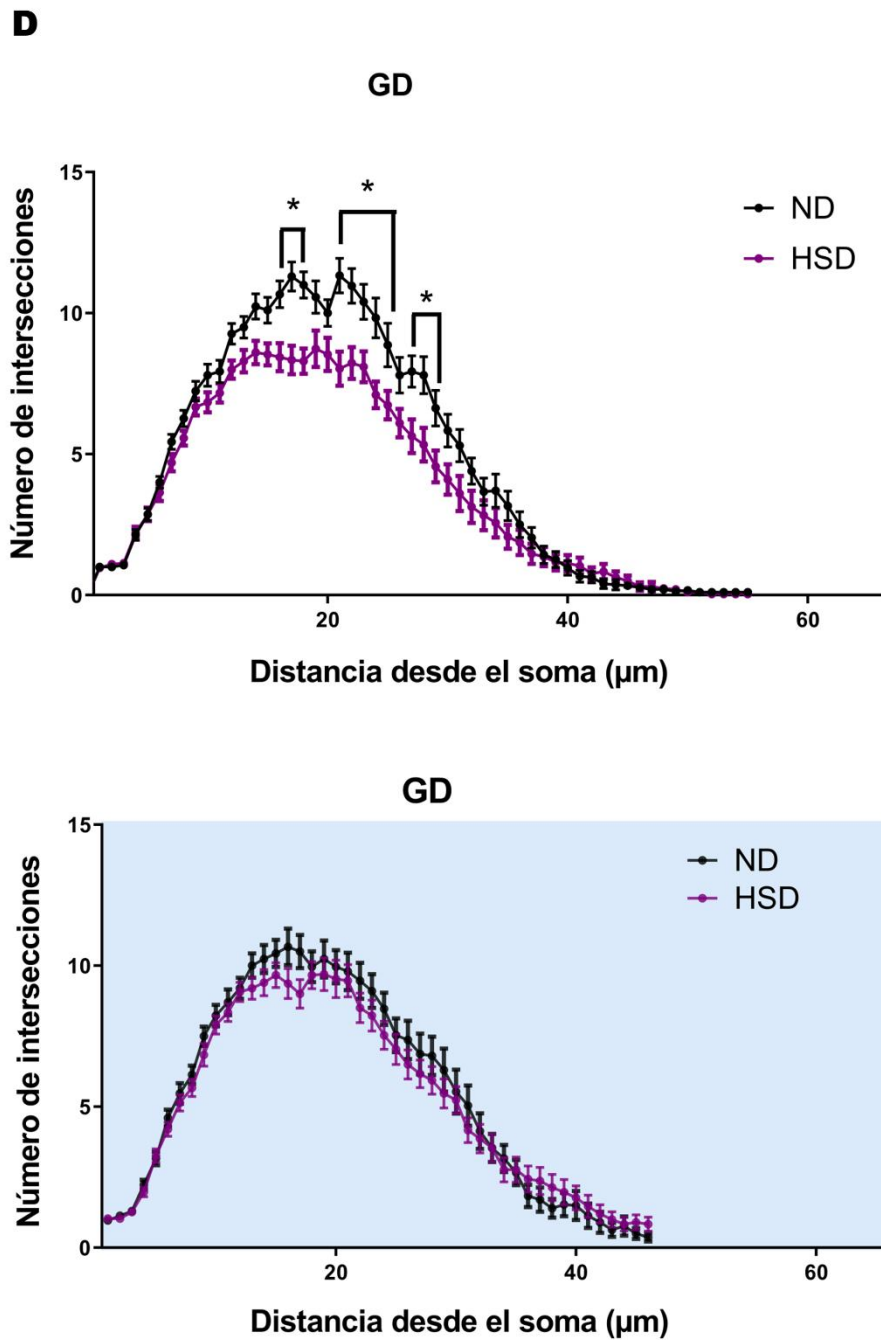
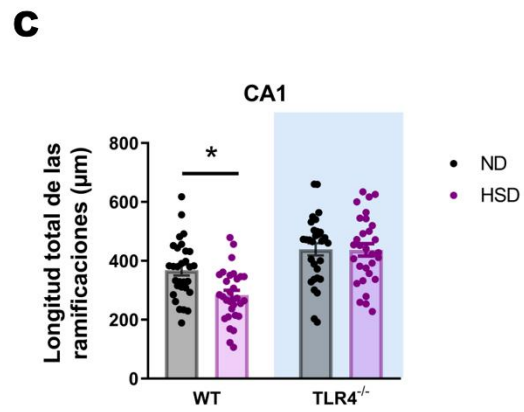
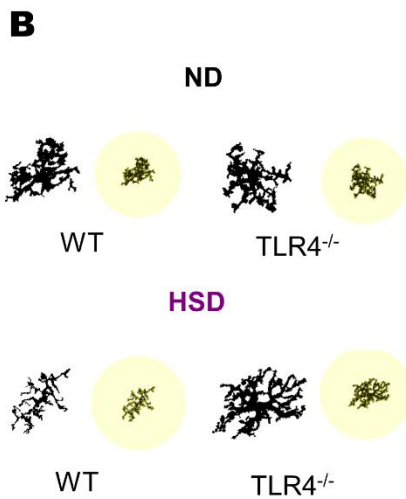
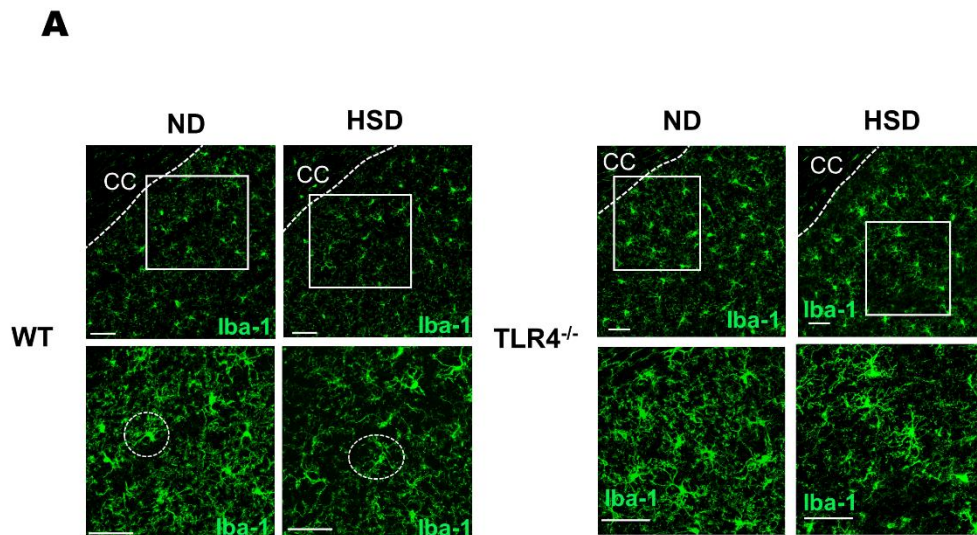


Figura 51. Análisis morfológico de la activación microglial en el GD en animales WT y TLR4^{-/-} en el modelo HSD. **(A)** Imágenes representativas del marcaje de Iba-1 en animales WT y TLR4^{-/-} tras 5 semanas de dieta. **(B)** Reconstrucciones representativas de las células iba-1+ obtenidas con el Plugin Simple Neurite Tracer del Software Fiji. **(C)** Análisis de la longitud de ramificaciones en la región CA1 del hipocampo en animales WT y TLR4 (D) Análisis por Shol del número de ramificaciones de las células Iba-1+ en el GD en animales WT (superior) y TLR4^{-/-} (inferior) tras 5 semanas de dieta. Datos representados como media ± SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Sidak (C) y Tukey (D) (n=30 células/3 animales *p<0,05 vs WT ND). Escalas = 50 micras.



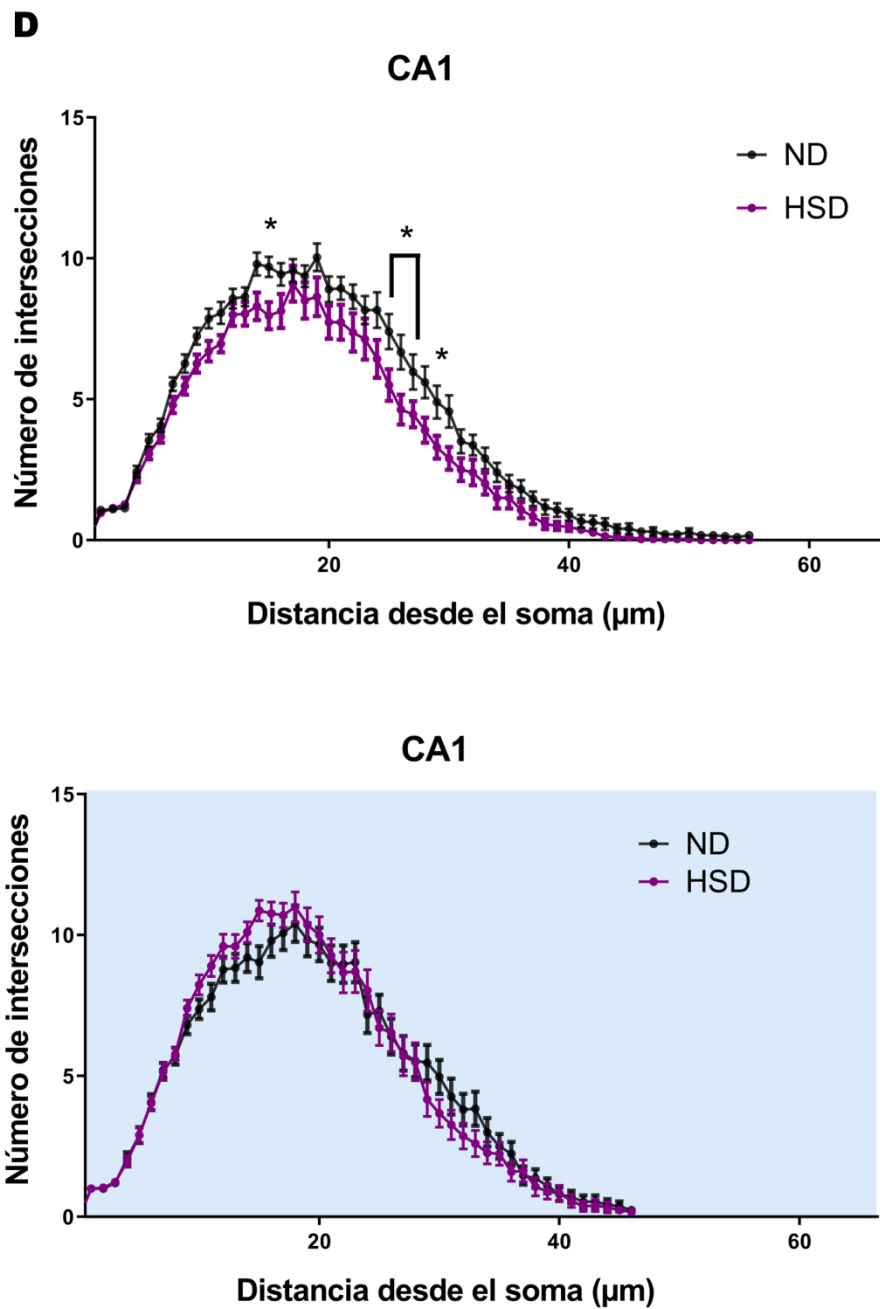


Figura 52. Análisis morfológico de la activación microglial en CA1 en animales WT y TLR4^{-/-} en el modelo HSD. **(A)** Imágenes representativas del marcaje de Iba-1 en animales WT y TLR4^{-/-} tras 5 semanas de dieta. **(B)** Reconstrucciones representativas de las células Iba-1+ obtenidas con el Plugin Simple Neurite Tracer del Software Fiji. **(C)** Análisis de la longitud de ramificaciones en CA1 en animales WT y TLR4^{-/-} **(D)** Análisis por Sholl del número de ramificaciones de las células Iba-1+ en CA1 en animales WT (arriba) y TLR4^{-/-} (abajo) tras 5 semanas de dieta. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Sidak (C) y Tukey (D) (n=30 células/3 animales *p<0,05 vs WT ND). Escalas = 50 micras.

4.5.5. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Puesto que las alteraciones observadas a nivel del hipocampo en animales WT tras 5 semanas de dieta HSD parecen no ocurrir en animales $TLR4^{-/-}$, decidimos comprobar si la permeabilidad de la barrera hematoencefálica se encuentra alterada en estos animales, para lo que realizamos una tinción mediante inmunofluorescencia de la IgG extravasada al parénquima del hipocampo. Los resultados muestran cómo, al igual que ocurre en los animales WT, no se observa alteración en la permeabilidad de la barrera en respuesta a la dieta HSD (**Figura 53 A,B**). Además, dado que en los animales WT se ha descrito un aumento de IL-17 en plasma (Faraco et al., 2018), decidimos evaluar si esta citoquina podría estar alcanzando el parénquima cerebral mediante un ensayo ELISA en el hipocampo, no observándose diferencias significativas en ninguno de los grupos (**Figura 53 C**).

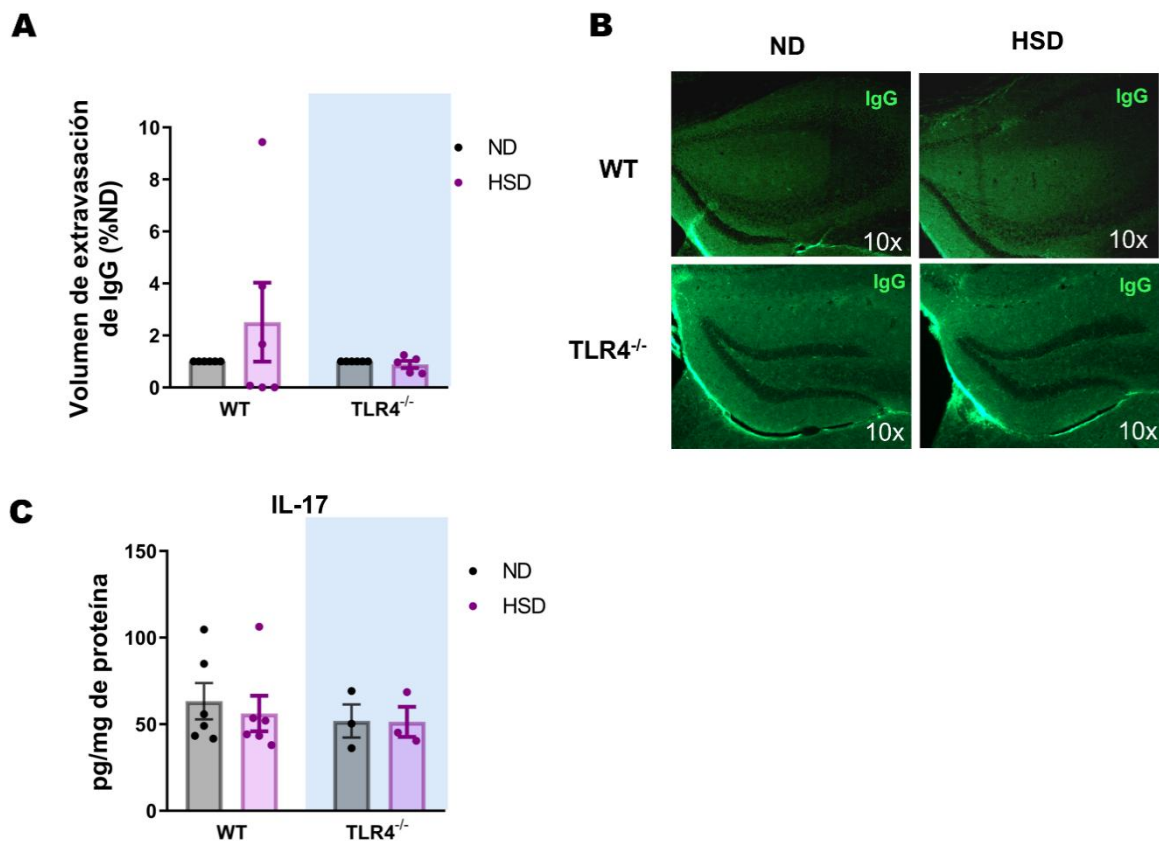


Figura 53. Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en animales WT y $TLR4^{-/-}$ tras 5 semanas de HSD (**A**) Cuantificación del volumen de IgG extravasado al parénquima, representado como % con respecto a los animales ND. (**B**) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de IgG en el hipocampo en animales WT y $TLR4^{-/-}$ (**C**) Cuantificación de los niveles de IL-17 en el hipocampo tras 5 semanas de dieta en animales WT y $TLR4^{-/-}$. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías (n=5-6 por grupo).

4.5.6. Evaluación de las alteraciones en marcadores periféricos asociado al modelo HSD en ratones TLR4^{-/-}

El efecto a nivel cerebral de la dieta HSD se enmarca dentro de las interacciones del eje intestino-cerebro (Faraco et al. 2018). Recientemente se ha propuesto una respuesta inflamatoria a nivel periférico como uno de los mecanismos responsables de los efectos observados a nivel cerebral. Esta respuesta inflamatoria consiste en un aumento de la diferenciación de los linfocitos T hacia Th17, productores de IL-17 (Faraco et al. 2018). Dado que el receptor TLR4 modula la respuesta inflamatoria y se encuentra expresado en linfocitos T, nos preguntamos si la menor aparición de alteraciones a nivel cerebral en los animales TLR4^{-/-} podría deberse a una menor diferenciación de los linfocitos T hacia Th17 o a una menor producción de citoquinas por parte de estos.

4.5.6.1. Perfil de diferenciación de los linfocitos T hacia Th17

En primer lugar, estudiamos el perfil de diferenciación de los linfocitos T naïve hacia el fenotipo efector Th17 mediante citometría de flujo. Para ello utilizamos el bazo de animales WT y TLR4^{-/-} tras 5 semanas de dieta. Elegimos el bazo al ser un órgano linfoide capaz de movilizar linfocitos T y dirigir la respuesta inmune periférica, en el que previamente se ha descrito el aumento de linfocitos Th17 en animales WT en respuesta a la dieta HSD (Faraco et al. 2018).

Los resultados muestran que, tras 5 semanas de dieta, se produce un aumento en la población de linfocitos Th17 en los animales TLR4^{-/-}, mientras que, como previamente se ha descrito, se observa una tendencia en los animales WT (Figura 54). Esto nos indica que la polarización de los linfocitos T hacia Th17 tiene lugar independientemente del receptor TLR4.

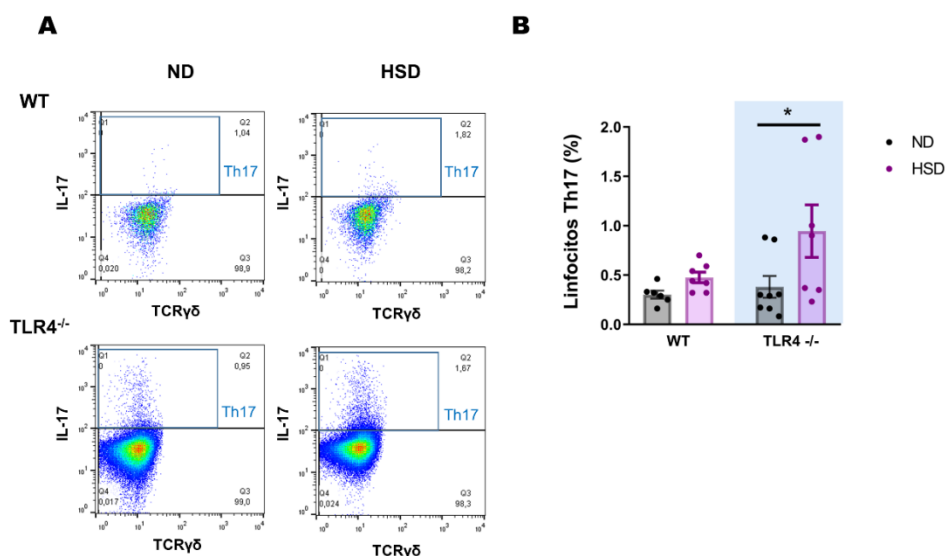


Figura 54. Análisis de la población de linfocitos Th17 en el bazo de animales WT y TLR4^{-/-} tras cinco semanas de dieta. **(A)** Representación de los linfocitos Th17 en los animales WT y TLR4^{-/-} **(B)** Cuantificación del porcentaje de linfocitos Th17 con respecto al total de linfocitos en los animales WT y TLR4^{-/-} tras cinco semanas de dieta. Datos representados como media ± SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Sidak (n=6-8 animales por grupo *p<0,05).

4.5.6.2. Evaluación de los niveles de citoquinas circulantes

En segundo lugar, dada la polarización de los linfocitos hacia Th17 en los animales carentes de TLR4, comprobamos si la ausencia del receptor podría estar alterando los niveles de citoquinas secretadas. Para ello realizamos una medida de citoquinas en plasma, tanto pro como antiinflamatorias, en animales WT y TLR4^{-/-} mediante un ensayo de CBA. Las citoquinas estudiadas fueron las siguientes: IL17A, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4 e IL-10 (Figura 55).

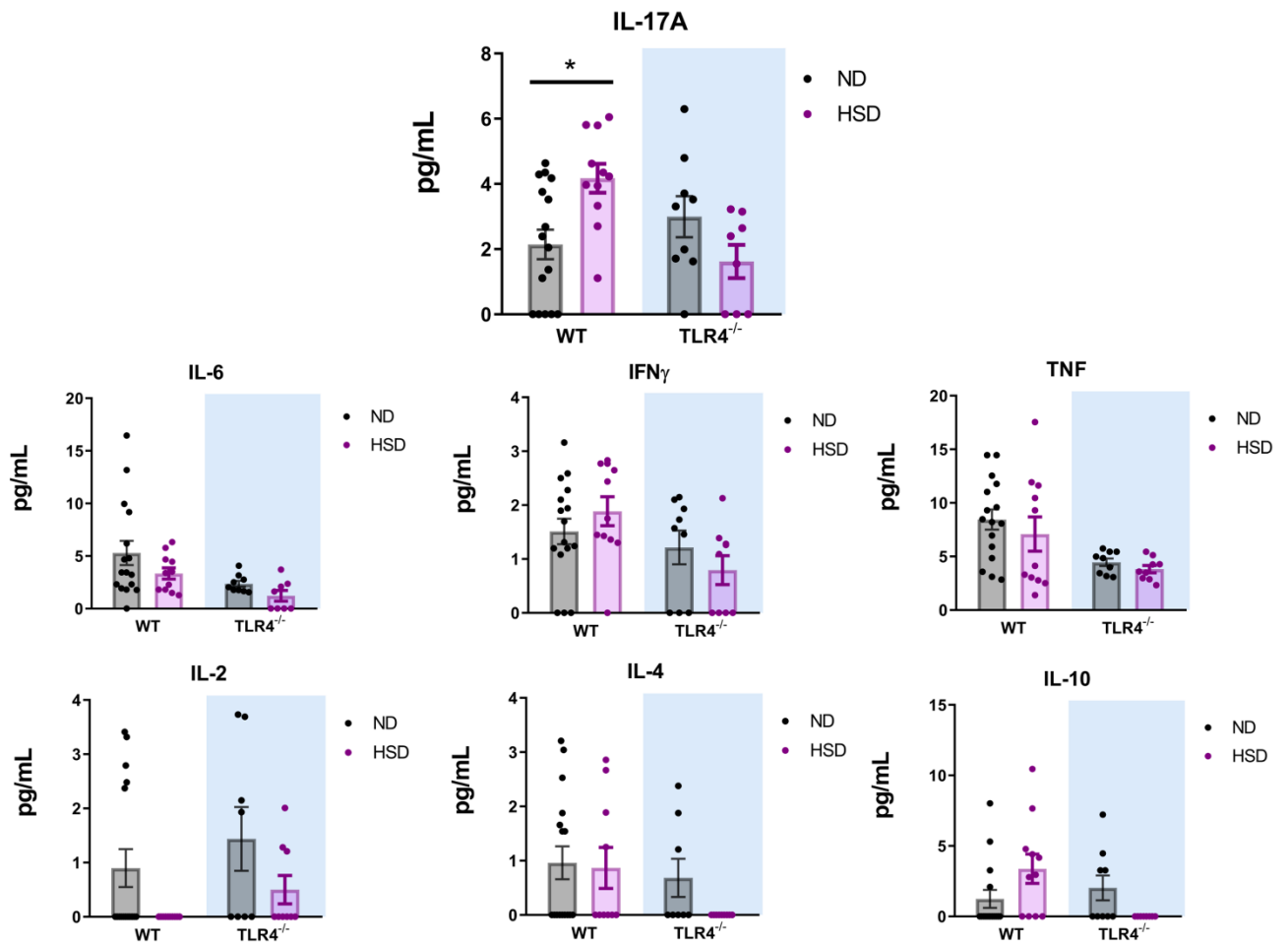


Figura 55. Niveles proteicos de IL17A, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4 e IL-10 en plasma de animales WT y TLR4^{-/-} tras cinco semanas de dieta, analizados mediante CBA. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n=6-16 animales por grupo *p<0,05).

Los resultados muestran un aumento de IL-17A en los animales WT tras 5 semanas de HSD, en concordancia con lo descrito previamente (Faraco et al. 2018). Sin embargo, este aumento no se observa en los animales TLR4^{-/-}. Este resultado nos indica que la producción y/o la liberación de IL-17 se encuentran alteradas en los animales carentes de TLR4, por lo que TLR4 se encuentra directamente implicado en el desarrollo de la respuesta inmune periférica asociada a la dieta HSD. Para el resto de citoquinas estudiadas, no se encontraron diferencias significativas ni en los animales WT ni en los TLR4^{-/-} en respuesta a la dieta HSD.

4.5.6.3. NETosis en plasma

Finalmente, ya que la dieta alta en sodio desencadena una respuesta inmune periférica, nos preguntamos si la producción de NETs por parte de los neutrófilos podría estar alterada. Por ello, medimos la presencia de NETs en plasma, tanto en animales WT como TLR4^{-/-}, tras 5 semanas de dieta, mediante un ensayo elisa. Los resultados no muestran diferencias en los niveles de NETs entre los animales con dieta normal y los HSD en ninguno de los dos genotipos, por lo que la liberación periférica de NETs no se ve alterada por la dieta HSD (**Figura 56**).

A

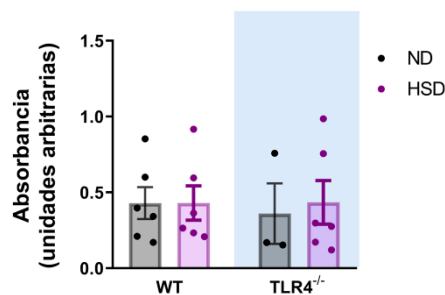


Figura 56. Cuantificación de la presencia de NETs en plasma en animales WT y TLR4^{-/-} tras cinco semanas de dieta mediante ensayo ELISA. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n= 3-6 por grupo).



DISCUSIÓN

El interés en el estudio del deterioro cognitivo vascular ha crecido notablemente durante la última década, en parte gracias al establecimiento de modelos animales capaces de replicar, en mayor o menor medida, la patología observada en humanos, y también a la cada vez más acuciante necesidad de investigar los mecanismos implicados debido a su altísima prevalencia. A pesar de que una de las principales manifestaciones del DCV es la aparición de déficits en tareas dependientes del hipocampo, frecuentemente el interés se ha centrado en el estudio de la sustancia blanca, con poco detalle en las implicaciones del propio hipocampo. Hasta el momento, los mecanismos propuestos en la literatura para explicar el DCV son poco específicos, con poca o nula información acerca del papel de la neurogénesis hipocampal en el desarrollo del deterioro cognitivo.

Por este motivo, el objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio de la neurogénesis hipocampal en dos modelos de DCV: el modelo de BCCAs y la dieta HSD.

5.1. Búsqueda de dianas terapéuticas en el modelo BCCAs

5.1.1. El modelo BCCAs induce déficits cognitivos y motores

En primer lugar, en nuestro modelo de BCCAs, encontramos **deficits de memoria**, tanto por medio de protocolos anterógrados como retrógrados, tras diferentes tiempos de hipoperfusión. Tras 1 mes encontramos un déficit en la memoria mediante el protocolo retrógrado del test de condicionamiento al miedo contextual, mientras que los tests de memoria realizados por medio de un protocolo anterógrado no muestran alteraciones a este tiempo. En contraste con nuestros resultados, otros autores han descrito la aparición de déficits tras 1 mes de hipoperfusión mediante el empleo de diferentes tests a los utilizados en esta tesis doctoral. Concretamente, se han descrito alteraciones en la memoria espacial mediante el laberinto de agua de Morris (Ben-Ari et al. 2019, Hao et al. 2018, Park J. H. et al. 2019a, Park S. Y. et al. 2019b, Sun et al. 2018, Wan et al. 2017), en la memoria de trabajo, tanto en el laberinto radial de 8 brazos (Hou et al. 2015, Patel et al. 2017, Shibata et al. 2007), como en la alternancia espontánea en el laberinto en Y (Hou et al. 2015, Maki et al. 2011, Miyanohara et al. 2018, Tsai et al. 2017) o en el reconocimiento de nuevos objetos en el test de reconocimiento de objeto nuevo (RON) (Ben-Ari et al. 2019, Miyanohara et al. 2018, Patel et al. 2017). Esta aparente discrepancia podría deberse a la diversidad de tests empleados, cada uno basado en tareas que involucran regiones cerebrales diferentes en cada caso. De hecho, la mayoría de estos estudios señala al daño en la sustancia blanca, con la consiguiente disrupción de los circuitos fronto-subcorticales, como posible responsable del deterioro cognitivo observado. Además, también se encuentran discrepancias empleando el mismo test cognitivo, como ocurre en nuestro caso con el test de alternancia espontánea, donde no encontramos las diferencias descritas por otros autores. En este sentido, el modelo BCCAs resulta en ocasiones variable,

no encontrándose siempre el mismo nivel de afectación, tanto comportamental como histológicamente (Boehm-Sturm et al. 2017).

Tras 3 meses de hipoperfusión, nuestros datos muestran cómo a este tiempo ya es detectable un déficit en la memoria empleando un protocolo anterógrado en los tests de nueva localización de objeto y laberinto en Y, mientras que puede tratarse de un tiempo demasiado largo para el estudio de protocolos retrógrados, puesto que la respuesta de *freezing* en el condicionamiento al miedo contextual de los animales incluso del grupo control es demasiado baja para detectar diferencias entre los grupos. A este tiempo otros autores también han descrito déficits en la memoria espacial mediante el test de Barnes (Nishio et al. 2010) y en la memoria de trabajo en el laberinto radial de 8 brazos (Hase et al. 2018, Nishio et al. 2010).

Sin embargo, a pesar de la diversidad de tests empleados que encontramos en la literatura, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral concuerdan con la tendencia general descrita hasta el momento, indicando la aparición de déficits de memoria tras 1 y 3 meses de hipoperfusión en el modelo BCCAs. Esta diversidad, además, pone de manifiesto la existencia de varios sustratos neurológicos afectados, así como la dificultad que supone el estudio de un proceso tan complejo como la memoria, en el que participan varias regiones cerebrales, siendo difícil diferenciar una única estructura responsable del déficit observado en cada uno de los tests.

En segundo lugar, además de los déficits de memoria, nuestros resultados indican un **déficit motor** asociado al modelo BCCAs, de acuerdo con el hecho de que la discapacidad motora es uno de los síntomas característicos del DCV en humanos, asociada a la disrupción de los circuitos de control motor que involucran estructuras como los ganglios basales y el estriado (Roman et al. 2002). Esto se refleja tanto en el test de la huella, con el uso de pasos más cortos en los animales BCCAs tras 1 mes de hipoperfusión, como en una menor velocidad de nado tras 3 meses de hipoperfusión en el test motor de natación, indicativos de alteraciones en las estructuras de control motor, como los ganglios basales.

A pesar de que pocos estudios se centran en la función motora en el modelo BCCAs, algunos autores han indicado la aparición de déficits motores tras 3 meses por medio del test de *beam walking*, pero no mediante el rotarod (Nishio et al. 2010). Esto puede deberse a que el *beam test* es mucho más sensible que el rotarod a la hora de detectar déficits motores y de coordinación (Luong et al. 2011). A tiempos más tempranos, sin embargo, no parecen detectarse cambios ni mediante el rotarod ni en la fuerza neuromuscular (Ben-Ari et al. 2019, Shibata et al. 2007).

Finalmente, en ninguno de los tiempos estudiados se detectaron comportamientos de **ansiedad o depresión** en los animales BCCAs. Los cambios en el humor se asocian en el DCV en humanos a los estadios más graves de la enfermedad, por lo que es posible que los tiempos estudiados aún sean demasiado tempranos para encontrar estas alteraciones. Consistente con esto, otros autores tampoco han encontrado comportamientos de ansiedad o

depresión ni tras 1 mes ni tras 3 meses de hipoperfusión (Ben-Ari et al. 2019, Nishio et al. 2010, Shibata et al. 2007).

5.1.2. El deterioro cognitivo inducido por el modelo BCCAs no se asocia a alteraciones morfológicas hipocampales.

A pesar de que los déficits de memoria encontrados apuntan a la implicación del hipocampo en el deterioro cognitivo, nuestros datos muestran que la hipoperfusión no provoca cambios en el volumen ni del hipocampo total ni del giro dentado en los tiempos estudiados. La ausencia de daño a nivel histológico en el hipocampo a estos tiempos es algo que ya ha sido descrito ampliamente por varios autores (Patel et al. 2017, Shibata et al. 2004, Shibata et al. 2007). Sin embargo, a tiempos superiores a los estudiados en esta tesis doctoral (8 meses) sí se ha descrito la aparición de una importante atrofia hipocámpal (Nishio et al. 2010).

Dada la ausencia de cambios evidentes en la sustancia gris del hipocampo, muchos de los estudios realizados hasta el momento se han centrado en la sustancia blanca, tanto por medio de técnicas de imagen, como la DTI, como mediante histología. Nuestros resultados de DTI muestran únicamente un descenso en la fracción de anisotropía (FA) en la comisura anterior tras 3 meses de hipoperfusión, indicativo de pérdida de la integridad de la sustancia blanca (Assaf and Pasternak 2008), lo que puede deberse al bajo número de animales empleado en el experimento (2-4), ya que varios autores han señalado la existencia de daño en la sustancia blanca a diferentes tiempos, aunque otros describen, al igual que en nuestro caso, la ausencia de cambios en la FA descritos en la literatura, atribuible a la variabilidad intrínseca del modelo (Boehm-Sturm et al. 2017). En este sentido, inicialmente se describió un descenso en la intensidad de la tinción de Kluver-Barrera para sustancia blanca en el cuerpo caloso y cápsula interna tras 1 mes de hipoperfusión (Shibata et al. 2004). Estos resultados han sido replicados por varios autores, tanto histológicamente (Duan et al. 2012, Fuchtemeier et al. 2015, Reimer et al. 2011, Shibata et al. 2007), como mediante DTI, incluyéndose estructuras como la comisura anterior (Ben-Ari et al. 2019, Boehm-Sturm et al. 2017, Holland et al. 2011, Holland et al. 2015).

Esta disrupción de la sustancia blanca se considera responsable, al menos en parte, del déficit cognitivo observado en los animales BCCAs. Un estudio publicado recientemente muestra una correlación positiva entre el descenso de la FA en el cuerpo caloso y el número de errores en el laberinto radial de 8 brazos tras 1 mes de hipoperfusión (Ben-Ari et al. 2019). En este sentido, aquellos tests cognitivos basados en tareas que requieren la participación de la corteza, e involucran, por tanto, conexiones fronto-subcorticales, parecen ser los indicados para detectar déficits tras 1 mes de hipoperfusión. Este es el caso del test de reconocimiento de objeto nuevo, que requiere, además del hipocampo, la participación de áreas asociativas de la corteza para el reconocimiento del objeto (Antunes and Biala 2012), el aprendizaje espacial en el laberinto de Morris (D'Hooge and De Deyn 2001) o la memoria de trabajo en el laberinto de 8 brazos (Jones 2002). Esto podría explicar el déficit observado en el test de

condicionamiento al miedo contextual tras 1 mes de hipoperfusión ya que, según varios autores, este test requiere además del hipocampo, la participación de áreas corticales como el córtex frontal o el cíngulo, además de la amígdala (Curzon et al. 2009).

5.1.3. La reducción de la neurogénesis hipocampal es concomitante al deterioro cognitivo en el modelo BCCAs.

Actualmente, la caracterización de los mecanismos más allá de la disrupción de la sustancia blanca, responsables de la pérdida de capacidades cognitivas en el DCV, es uno de los retos de la comunidad científica. Hasta el momento se han descrito fenómenos de carácter general desencadenados por la reducción del FSC, como el estrés oxidativo, una respuesta neuroinflamatoria y un estado hipóxico crónico. A pesar de que estos mecanismos afectan al hipocampo de igual manera que a la sustancia blanca, pocos autores se han centrado en el estudio en detalle del hipocampo en el modelo BCCAs, posiblemente ante la ausencia aparente de daño observado mediante histología.

Sin embargo, el hipocampo es una de las regiones cerebrales clave en el proceso de memoria, por lo que, a pesar de que sean varios los mecanismos diferentes que confluyan en el DCV para desencadenar el deterioro cognitivo, la alteración de alguno de los factores de la fisiología hipocampal debe tenerse en cuenta como uno de los posibles mecanismos responsables del déficit de memoria observado en el DCV. En este sentido, la neurogénesis hipocampal, a pesar de ser objeto de controversia desde su origen, parece jugar un papel en diferentes contextos neurodegenerativos, como la EA, así como en etapas tempranas de la enfermedad de Parkinson (Donovan et al. 2006, Han M. H. et al. 2016, Moreno-Jimenez et al. 2019, Rodriguez et al. 2008, Tobin et al. 2019).

Nuestros resultados indican que el déficit neurogénico aparece a largo plazo, siendo detectable tras 3 meses de hipoperfusión. En concordancia con estos datos, algunos autores han descrito una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, que apunta al descenso en los niveles de células DCX⁺, tras 2 meses de hipoperfusión (Ben-Ari et al. 2019). Además, la ausencia de diferencias en el número de células DCX⁺/BrdU⁺ que hemos observado parece sugerir que la hipoperfusión afecta a la supervivencia de los neuroblastos inmaduros, pero no a la proliferación de las NPCs. En este sentido, se ha descrito que el enriquecimiento ambiental o el ejercicio físico atenúan el deterioro cognitivo en los animales BCCAs (Hase et al. 2018, Leardini-Tristao et al. 2017). Si bien en estos estudios el efecto no se atribuye directamente a una mayor respuesta neurogénica, está bien establecido que tanto el ejercicio como el enriquecimiento ambiental aumentan el número de nuevas neuronas en el giro dentado (Kempermann 2019, van Praag et al. 2002, van Praag et al. 2005), por lo que no se puede descartar que, además de los efectos sobre la sustancia blanca o la disminución del estrés oxidativo, la mejoría del déficit cognitivo sea debida, también en parte, a una mayor respuesta neurogénica en estos animales, capaz de compensar el descenso provocado por la hipoperfusión. En esta misma línea, a pesar de que los efectos del ejercicio en humanos se

encuentran bajo debate (Miller et al. 2012), varios estudios señalan un menor riesgo de demencia, así como un menor progreso de la enfermedad en aquellos pacientes con actividad física (Forbes et al. 2008, Larson et al. 2006, Rovio et al. 2005, Wang L. et al. 2006, Weuve et al. 2004).

También es importante señalar que, en el modelo en rata, se ha descrito un aumento temprano (8 días de hipoperfusión) tanto en proliferación como en el número de nuevas neuronas DCX⁺. En este sentido, nuestros resultados a tiempos cortos muestran una tendencia hacia un mayor número de células DCX⁺, tanto tras 1 día como 7 días de hipoperfusión. En el contexto del ictus isquémico, se ha observado que la isquemia cerebral provoca una respuesta en el nicho neurogénico, aumentando tanto la proliferación de progenitores como las nuevas neuronas (Cuartero et al. 2019, Darsalia et al. 2005), por lo que no podemos descartar la posibilidad de que la reducción repentina del flujo que tiene lugar tras la colocación de los *microcoils* (reduciéndose hasta aproximadamente un 70% del original; (Shibata et al. 2004) actúe de manera análoga a la isquemia, provocando una potenciación de la neurogénesis en tiempos tempranos, que vuelve a valores normales una vez comienza la recuperación del flujo.

El descenso de la neurogénesis tras 3 meses de hipoperfusión coincide en nuestro caso con la detección de déficits cognitivos en el test de nueva localización de objeto y el laberinto en Y, tests que dependen casi en su totalidad de la integridad del hipocampo. En estos tests, especialmente en el de nueva localización de objeto, la tarea a realizar requiere que el animal realice una codificación de dos objetos iguales situados a pocos centímetros de distancia. Una codificación correcta permite que el animal distinga que se trata de dos objetos distintos, de forma que, cuando posteriormente uno de los objetos es cambiado de posición, el animal es capaz de reconocer este cambio, explorando el objeto desplazado como si fuera nuevo. Una codificación incorrecta, por el contrario, no distingue los dos objetos, por lo que el cambio de posición no es detectado y ambos objetos se exploran por igual. Este proceso, conocido como separación de patrones, resulta esencial para evitar la interferencia entre dos recuerdos (Rolls E. T. 1996) y, según se ha propuesto por varios modelos, depende de las nuevas neuronas del giro dentado, en parte debido a su mayor excitabilidad y plasticidad en comparación con las neuronas maduras (Esposito et al. 2005, Ge S. et al. 2007). De este modo, nuestro estudio pone de manifiesto la implicación de la neurogénesis hipocampal en el deterioro cognitivo a este nivel observado en el modelo BCCAs.

Además del número de nuevas neuronas en el giro dentado, las alteraciones en la neurogénesis hipocampal también pueden afectar a la morfología de los neuroblastos. Dado que el árbol dendrítico de estas nuevas neuronas se integra en los circuitos hipocampales ya establecidos, una arborización dendrítica aberrante puede causar alteraciones de memoria, efecto que se ha descrito en el contexto de la demencia post-ictus (Cuartero et al. 2019). A pesar de que nuestros resultados no muestran diferencias evidentes en la morfología del árbol dendrítico de los neuroblastos entre los animales BCCAs y sus controles sham, es cierto que la realización de este análisis mediante la cuantificación de la inmunofluorescencia de DCX no es

la técnica más sensible ya que no se logra un completo marcaje de las dendritas, por lo que se requieren técnicas más específicas que permitan la completa visualización del árbol dendrítico.

A pesar de que a nivel histológico no se han descrito cambios en el hipocampo en los animales BCCAs hasta pasados 8 meses de hipoperfusión, nuestros resultados muestran que un análisis más detallado sí revela alteraciones en la fisiología del hipocampo a nivel del proceso de neurogénesis y que son consistentes con su implicación en las tareas de memoria. En este sentido, algunos autores han descrito alteraciones en la potenciación a largo plazo por medio de técnicas de electrofisiología, acompañadas de un descenso de proteínas sinápticas como sinapsina I, el receptor de NMDA R1, PSD95, así como en la densidad de espinas dendríticas en el giro dentado por medio de la tinción de Golgi-Cox (Hao et al. 2018, Park J. H. et al. 2019a), datos compatibles con la disminución del número de nuevas neuronas descrito en esta tesis doctoral.

De manera similar a los resultados obtenidos en el contexto del DCV en esta tesis doctoral, datos procedentes de animales transgénicos muestran una disminución de la neurogénesis en el giro dentado en la EA (Donovan et al. 2006, Rodriguez et al. 2008), resultados que han sido corroborados recientemente en pacientes humanos (Moreno-Jimenez et al. 2019, Tobin et al. 2019) poniendo de manifiesto la importancia del estudio de la neurogénesis hipocampal en las enfermedades neurodegenerativas.

5.1.4. El modelo BCCAs provoca una activación microglial en el hipocampo

La respuesta neuroinflamatoria como consecuencia del descenso del FSC es otro de los mecanismos ampliamente propuestos como responsables del DCV, pudiendo afectar tanto a la integridad del hipocampo y de los circuitos cerebrales como a la respuesta neurogénica. En este sentido, durante las últimas décadas cada vez hay más evidencias de la contribución de la microglía en el progreso de enfermedades neurodegenerativas como la EA, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica e incluso enfermedades psiquiátricas como la depresión o la esquizofrenia (Maiti et al. 2017, Malko et al. 2019, Ramirez et al. 2017, Yirmiya et al. 2015). A pesar de ser enfermedades con sintomatologías muy distintas, todas ellas parecen tener en común la activación crónica de la microglía, que resulta en un aumento de las citoquinas pro-inflamatorias en el parénquima cerebral, comprometiendo la integridad de las neuronas y contribuyendo así a la neurodegeneración.

En lo que respecta al hipocampo, hasta el momento pocos estudios se han centrado en la activación microglial en esta estructura. Nuestros resultados indican que, tras 1 y 3 meses de hipoperfusión, la microglía en los animales BCCAs presenta una morfología acorde con un estado activado en dos subregiones del hipocampo, como son el GD y CA1. En consonancia con estos datos, otros autores han descrito un aumento en el marcaje del marcador microglial CD11b, así como un aumento de la proliferación de la microglía mediante la colocalización CD11b/ki67, cambios que comienzan tras 14 días de hipoperfusión (Roberts et al. 2018).

La presencia de una microglía activada en estas regiones y, especialmente, en el GD puede tener importantes consecuencias en los procesos de memoria. En este sentido, se ha descrito que la presencia tanto de citoquinas pro-inflamatorias como de EROs liberadas por la microglía afecta negativamente a la neurogénesis hipocampal, pudiendo actuar tanto en la proliferación de progenitores como en la supervivencia de los neuroblastos (Borsini et al. 2015, Whitney et al. 2009). Además, se ha descrito cómo, en condiciones fisiológicas, la microglía ramificada regula la cascada neurogénica por medio de la fagocitosis de 2/3 de los progenitores neurales que se encuentran en proliferación, de modo que únicamente 1/3 de éstos alcanza el estado de neuroblasto (Sierra et al. 2013). Así, no puede descartarse que, en condiciones patológicas, el aumento de la capacidad fagocítica de la microglía activada contribuya a la desregulación de la cascada neurogénica y/o a la pérdida de sinapsis.

Por otra parte, en los animales BCCAs existen múltiples evidencias de la activación microglial aunque en la sustancia blanca, siendo ésta una de las principales características del modelo. Así, se ha descrito un aumento de la activación microglial a partir de los 7 días de hipoperfusión en el cuerpo calloso, caudado putamen y la cápsula interna, siendo las regiones con mayor activación microglial las que presentan un mayor daño en la sustancia blanca (Ben-Ari et al. 2019, Hou et al. 2015, Shibata et al. 2004). Concretamente, en el cuerpo calloso esta activación se acompaña de un aumento de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Hou et al. 2015, Miyanohara et al. 2018, Tsai et al. 2017), a la vez que es posible correlacionar la densidad de células microgliales presentes en el tejido con el valor de la FA (Ben-Ari et al. 2019).

En línea con todo lo anterior, varios trabajos han determinado cómo el tratamiento con compuestos antiinflamatorios, con la consiguiente reducción de la activación microglial y de las vías neuroinflamatorias, consigue mitigar el daño en la sustancia blanca, así como el déficit cognitivo en distintos modelos de DCV, apuntando a la microglía como un firme candidato a una posible diana terapéutica en la demencia vascular (Shin et al. 2018, Su et al. 2017, Tsai et al. 2017).

5.1.5. El modelo BCCAs provoca un aumento de la permeabilidad de la BHE, sin alterar la vascularización del hipocampo

A pesar de que la respuesta neuroinflamatoria parece ser un mecanismo clave en el DCV, actualmente se desconoce el motivo de la activación microglial. Ya que la microglía es la primera en responder ante cambios en el medio extracelular, ésta podría estar respondiendo tanto a la propia hipoxia como al daño neuronal o a alteraciones en el medio extracelular derivadas de un aumento de la permeabilidad de la BHE (Block et al. 2007). El aumento de permeabilidad en la BHE, permitiendo la extravasación de componentes sanguíneos al parénquima, es una característica común a varias enfermedades neurodegenerativas, como la EA o la demencia vascular, tanto en modelos animales como en humanos, por lo que algunos autores lo proponen como un biomarcador temprano del deterioro cognitivo (Nation et al. 2019).

En nuestro modelo de BCCAs, los resultados muestran un aumento de permeabilidad de la BHE en el hipocampo conforme progresa el tiempo de hipoperfusión, siendo este aumento estadísticamente significativo pasados los 3 meses. Si bien es cierto que este aumento de permeabilidad es un mecanismo común a varias enfermedades neurodegenerativas, actualmente se desconoce si esta alteración es causa o consecuencia de la patología cerebral observada. El aumento de permeabilidad descrito en esta tesis doctoral puede deberse al propio proceso de hipoxia provocada por la hipoperfusión, donde los pericitos se desacoplan de los vasos, aumentando así la permeabilidad de la BHE y contribuyendo al daño neuronal (Liu Q. et al. 2019). Otro posible mecanismo es la respuesta inflamatoria desarrollada tras la hipoperfusión, ya que estudios previos han descrito un aumento de citoquinas pro-inflamatorias en el parénquima cerebral responsable del aumento de permeabilidad y que retroalimenta, a su vez, la respuesta inflamatoria (Geng et al. 2018).

En regiones de sustancia blanca, región en la que más se ha estudiado la BHE en el modelo BCCAs, se ha descrito cómo el aumento de su permeabilidad en el cuerpo calloso comienza en tiempos muy tempranos, encontrándose una mayor extravasación de IgG tras 1, 3, 7, 14 y 30 días de hipoperfusión (Liu Q. et al. 2019, Miyanohara et al. 2018). Los datos disponibles referentes al hipocampo apuntan en la misma dirección, encontrándose una mayor extravasación del colorante Evans Blue tras 14 días de hipoperfusión (Roberts et al. 2018). La aparente diferencia con nuestros resultados puede deberse al menor tamaño de la molécula de Evans blue con respecto a la IgG, que permite detectar cambios menores en la permeabilidad, o al área estudiada.

El aumento de permeabilidad de la BHE posibilita la extravasación de células sanguíneas al parénquima cerebral, como ocurre con los neutrófilos en la isquemia (García-Culebras et al. 2018). Sin embargo, a pesar de que en nuestro modelo de BCCAs la permeabilidad de la BHE se encuentra alterada, no encontramos la presencia de neutrófilos infiltrados en el parénquima del hipocampo.

Finalmente, dado que la hipoxia puede inducir la proliferación de progenitores endoteliales estimulando el proceso de angiogénesis (Plate 1999), nos preguntamos si la hipoperfusión podría provocar cambios en la vascularización del hipocampo. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias en densidad, tortuosidad o diámetro vascular entre los animales sham y BCCAs a ninguno de los tiempos estudiados. Esto resulta en cierta manera sorprendente, dado que la caída inicial del FSC se recupera gradualmente, indicando la existencia de algún tipo de compensación vascular. En este sentido, se ha propuesto que esta recuperación de flujo se debe al aporte de arterias colaterales, como la arteria comunicante posterior (Shibata et al. 2004), así como a una mayor tortuosidad en el polígono de Willis (Boehm-Sturm et al. 2017). Otros autores, sin embargo, han descrito una reducción del número de anastomosis en los territorios tanto de la arteria cerebral media y cerebral anterior como en el de la cerebral anterior y la cerebral posterior tras 30 días de hipoperfusión, sin cambios en el número de células endoteliales en proliferación (Roberts et al. 2018). En

conjunto, estos datos nos indican que son necesarios estudios en mayor detalle de la vasculatura con el fin de esclarecer el efecto de la hipoperfusión sobre la angiogénesis y/o el remodelado vascular.

5.1.6. Resumen de los posibles mecanismos hipocampales implicados en el DCV en el modelo BCCAs

En el primer objetivo de esta tesis doctoral hemos descrito que tanto la neurogénesis hipocampal como la activación microglial podrían jugar un importante papel en el DCV. En este sentido, un aumento de la activación microglial, así como un descenso de la respuesta neurogénica se presentan como posibles dianas terapéuticas que podrían contribuir a revertir el déficit cognitivo asociado al DCV. Experimentos futuros enfocados, por un lado, a una caracterización en detalle de la neurogénesis hipocampal en el modelo BCCAs, así como, por otro lado, al empleo de tratamientos capaces de estimular la neurogénesis y/o disminuir la neuroinflamación ayudarán a esclarecer el papel que estos dos mecanismos juegan en el DCV.

5.2. Búsqueda de dianas terapéuticas en el modelo HSD

El siguiente bloque de objetivos de esta tesis doctoral consistió en evaluar los efectos a nivel cognitivo de una dieta alta en sodio. Tradicionalmente, los estudios sobre esta dieta se han centrado en su papel en la hipertensión, existiendo numerosos trabajos que relacionan la dieta HSD con un mayor riesgo cardiovascular (Mente et al. 2018, Mente et al. 2016, Mozaffarian et al. 2014, O'Donnell et al. 2015). Sin embargo, recientemente se ha descrito que los efectos a nivel cognitivo de la dieta HSD no son necesariamente derivados de un aumento en la presión arterial, sino más bien a un descenso del FSC provocado por una alteración del endotelio vascular (Faraco et al. 2018). Dado que no existe demasiada información en la literatura acerca de los mecanismos desencadenados a nivel cerebral causantes del deterioro cognitivo, decidimos centrarnos en el estudio de la fisiología del hipocampo, estructura clave en los procesos de memoria, con el fin de esclarecer alguno de los mecanismos implicados en el deterioro cognitivo asociado a la dieta HSD.

5.2.1. La dieta HSD provoca un déficit de memoria tras 5 semanas

En los últimos años, cada vez son mayores las evidencias de la existencia de una relación entre la dieta y la salud mental (Gomez-Pinilla 2008). En este sentido, varios estudios epidemiológicos señalan una relación inversa entre la calidad de la dieta y trastornos como la ansiedad y la depresión (Akbaraly et al. 2009, Jacka et al. 2011, Jacka et al. 2010, Nanri et al. 2010, Sanchez-Villegas et al. 2009), así como con las capacidades cognitivas, especialmente en las poblaciones envejecidas (Gu and Scarmeas 2011, Kanoski and Davidson 2011, Solfrizzi et al. 2011). No obstante, debido a la dificultad de realizar una caracterización precisa de las cantidades de los nutrientes ingeridos, ya que la mayoría de las estimaciones se basan en cuestionarios, los estudios en humanos a menudo resultan contradictorios (Kendig and Morris 2019).

Nuestros resultados en animales alimentados con una dieta HSD muestran un déficit de memoria cuando se emplea un protocolo retrógrado, correspondiente a recuerdos anteriores a la dieta, en el test de condicionamiento al miedo contextual tras 5 semanas, mientras que no se observan diferencias si se emplea un protocolo anterógrado en el test de nueva localización de objeto, posiblemente porque se trate de un tiempo demasiado temprano. De esta forma, al igual que para el modelo BCCAs, el déficit de memoria observado con protocolos retrógrados en roedores parece ser detectable antes que el observado en protocolos anterógrados. De manera similar, otros estudios han mostrado también un efecto negativo del alto consumo de sal sobre la función cognitiva en animales, sin que existan cambios en la presión arterial. Concretamente, se ha descrito un déficit de memoria espacial en el laberinto de Morris en ratones tras 12 semanas de dieta con un 7% de sodio (Liu Y. Z. et al. 2014), así como en el test de nueva localización de objeto y en un protocolo anterógrado del test de condicionamiento al miedo contextual tras 7 semanas de dieta con un 8% de sal (Ge Q. et al. 2017). Con respecto a una dieta con un 4% en sodio, se ha descrito déficits en el test de reconocimiento de objeto

nuevo, en el test de Barnes y en la capacidad de construir un nido tras 12 semanas de dieta (Faraco et al. 2018). Resultados similares se han descrito en ratas alimentadas con una dieta del 8% en sodio, observándose un déficit en el laberinto radial de 8 brazos tras 4 semanas (Chugh et al. 2013). Así, el conjunto de datos existente en la literatura apoya firmemente el efecto negativo del consumo de sal, incluso en ausencia de hipertensión, sobre la función cognitiva, a la vez que los resultados obtenidos con diferentes tests, que exploran diferentes sustratos neurológicos, nos indican que probablemente más de una estructura cerebral se encuentre implicada en el deterioro cognitivo observado.

5.2.2. La dieta HSD altera la respuesta neurogénica hipocampal

Dado que, en el modelo BCCAs, el déficit de memoria es concomitante con una alteración de la respuesta neurogénica en el giro dentado, decidimos estudiar si ésta se veía similarmente afectada como consecuencia de la dieta HSD, encontrando que el déficit de memoria observado con un protocolo retrógrado también se acompaña en este caso de un descenso en el número de nuevas neuronas DCX⁺, junto con un aumento del número de progenitores tipo 1 en proliferación y una fuerte tendencia hacia un aumento del número de NPCs tipo 1. Esto podría sugerir que en este modelo se activan estas células saliendo de quiescencia, pero este aumento no se corresponde con un mayor número de células en el siguiente estadio de maduración, las NPCs tipo 2, por lo que la dieta HSD podría estar afectando a la supervivencia de los neuroblastos inmaduros.

En este sentido, se ha propuesto que la dieta HSD provoca una disminución en la liberación de NO endotelial, encontrándose un descenso del FSC debido a la consecuente vasoconstricción (Faraco et al. 2018). En conjunto con esto, una posibilidad es que el descenso de FSC provocado por la dieta HSD podría estar disminuyendo la respuesta neurogénica en el hipocampo, de manera similar a lo que ocurre en el modelo BCCAs, donde el descenso de neuroblastos también parece debido a una menor supervivencia de las células DCX⁺ en lugar de a cambios en la proliferación de los progenitores. En concordancia con nuestros resultados, también se han descrito evidencias de una reducción en la expresión de proteínas sinápticas sinapsina y sinaptofisina, así como una menor LTP en esta región tras 7 semanas de HSD (Ge Q. et al. 2017), lo que puede ser indicativo una menor presencia de neuronas maduras que se derive de la disminución de la respuesta neurogénica.

Como decíamos más arriba, los datos referentes al aumento en los NPC tipo 1 podría indicar que la exposición a una dieta alta en sodio estuviera induciendo su división simétrica hacia astrocitos reactivos que conduciría a una depleción del nicho como se ha descrito en otros modelos (Sierra et al. 2015). Son necesarios más estudios para clarificar este punto.

El patrón alimenticio es uno de los factores externos capaces de modular la respuesta neurogénica, como también lo son el ejercicio, el enriquecimiento ambiental (Kempermann 2019, van Praag et al. 2002, van Praag et al. 2005), el estrés o los glucocorticoides (Lucassen et al. 2015), con su consecuente efecto sobre tareas de memoria-aprendizaje. En este sentido,

son varios los estudios que relacionan diferentes nutrientes con aumento o disminución de la cascada neurogénica (Zainuddin and Thuret 2012). Algunos ejemplos son los flavonoides, el resveratrol o las dietas altas en grasas (Lee et al. 2010, Lindqvist et al. 2006, Moriya et al. 2011, Park H. R. et al. 2010, Yoo et al. 2010). A pesar de que los mecanismos por los que los componentes de la dieta son capaces de modificar la neurogénesis no se conocen con exactitud, sus efectos generalmente se relacionan con incrementos/descensos en los niveles de estrés oxidativo, tanto a nivel periférico como centrales, así como con sus propiedades pro/antiinflamatorias (Carey et al. 2019, Han T. K. et al. 2019). En este sentido, cambios en el ambiente del nicho neurogénico, ya sea por un descenso del FSC o por una mayor respuesta inflamatoria podrían estar afectando a la supervivencia de los neuroblastos.

Cabe destacar un estudio longitudinal, realizado en 1262 individuos de ente 67-84 años de edad, en el que se encontró una correlación entre la ingesta de sodio y el deterioro cognitivo, evaluado por medio del 3MS (*Modified Mini Mental State Evaluation*), un test ampliamente utilizado para valorar el grado de demencia. En este estudio, aquellos individuos con una mayor ingesta de sodio presentaban un mayor deterioro cognitivo a lo largo del tiempo, comparados con aquellos individuos con bajas ingestas de sodio. Sin embargo, esta correlación únicamente resultó significativa en aquel subgrupo de individuos con una baja actividad física, pero no para aquellos con una mayor actividad (Fiocco et al. 2012). A pesar de la actual controversia con respecto a la neurogénesis humana, dado que el ejercicio es uno de los moduladores positivos de la respuesta neurogénica, estos resultados podrían sugerir que la modulación de la neurogénesis hipocampal es una diana terapéutica en el deterioro cognitivo.

5.2.3. La dieta HSD provoca una respuesta microglial en el hipocampo

Nuestros resultados muestran una mayor activación microglial en el hipocampo, tanto en CA1 como en el GD de los animales alimentados con HSD durante 5 semanas. De acuerdo con estos datos, dos trabajos de reciente publicación en animales pre-hipertensos, alimentados con dietas HSD, encuentran una mayor activación microglial, así como un aumento de citoquinas pro-inflamatorias en el núcleo paraventricular talámico y en la amígdala basolateral (Gilman et al. 2019, Wang M. L. et al. 2018a).

Al igual que para el modelo BCCAs, la consecuente liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte de la microglía activada, así como de EROs, podría estar contribuyendo a la menor supervivencia observada en las nuevas neuronas del giro dentado, ya que se ha descrito un aumento de la producción de EROs y el consecuente estrés oxidativo en el hipocampo en respuesta a una dieta HSD (Ge Q. et al. 2017, Liu Y. Z. et al. 2014). Por otro lado, al igual que se comentó para el modelo BCCAs, el aumento de la activación microglial también podría estar aumentando su capacidad fagocítica y, con ello, disminuyendo la supervivencia de los progenitores neurales y/o de las sinapsis.

Sin embargo, a pesar de que los datos que implican la activación de la microglía en respuesta a una dieta HSD parecen cada vez más consistentes, el estímulo o ligando responsable de esta activación permanece siendo una incógnita. Dado que no se observa un aumento de los niveles plasmáticos de sodio como consecuencia de la dieta, es posible descartar que se trate de un efecto directo de la elevación de la concentración del ion Na^+ sobre las células microgliales. Una hipótesis verosímil es que la disbiosis provocada por la dieta HSD podría ser suficiente para provocar la activación microglial (Abdel-Haq et al. 2019), aunque actualmente se desconocen las señales que serían responsables en este caso.

El hecho de que la dieta HSD sea capaz de provocar cambios a nivel cerebral sugiere la idea de la existencia de un eje intestino-cerebro en el que, sin embargo, aún quedan por esclarecer gran parte de los mecanismos que permiten esta comunicación. Recientemente se ha propuesto a la microglía como el nexo entre la periferia y el SNC (Abdel-Haq et al. 2019). Concretamente, se ha visto cómo la microglía es capaz de responder ante cambios en la microbiota (Erny et al. 2015) y, dado que se ha propuesto que la dieta HSD provoca una disbiosis intestinal (Miranda et al. 2018), es posible que esta dieta provoque cambios en la microglía capaces de contribuir al deterioro cognitivo.

La dieta HSD provoca una respuesta inmune a nivel intestinal, con un aumento plasmático de la citoquina IL-17 (Faraco et al. 2018). En este sentido, cabría pensar que la microglía pudiera estar respondiendo a este aumento de IL-17 plasmático, el cual podría alcanzar el parénquima a través de los órganos circunventriculares, carentes de BHE; además se ha descrito que la IL-17 es capaz de provocar la activación microglial (Yu et al. 2016). Sin embargo, nuestros resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IL-17 en el hipocampo. Finalmente, dado que se ha descrito un descenso del FSC en respuesta a la dieta (Faraco et al. 2018), no se puede descartar que sea la propia hipoperfusión la que desencadene la respuesta microglial, o bien un efecto indirecto por medio de las células endoteliales de la BHE, capaces de enviar señales a las células microgliales (Perry 2004).

5.2.4. La dieta HSD no altera la permeabilidad de la BHE, la tensión arterial ni los niveles plasmáticos de Na^+

El aumento de la permeabilidad de la BHE podría ser otro de los mecanismos conducentes a una mayor activación microglial tras la dieta HSD. Sin embargo, nuestros resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas en la permeabilidad de la BHE en el hipocampo, si bien es cierto que se puede observar una tendencia hacia un aumento de permeabilidad en los animales HSD tras 5 semanas de dieta, por lo que no puede descartarse que, con tiempos más prolongados de HSD, sean detectables cambios en este parámetro. Otros autores tampoco han encontrado diferencias en la extravasación de FITC-dextrano en el hipocampo o en la corteza en respuesta a la dieta HSD, ni en los niveles de

expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales del cerebro (Faraco et al. 2018).

Esta diferencia entre la hipertensión, donde la alteración de la BHE tiene un papel importante, y el deterioro cognitivo asociado a la dieta alta en sal, puede explicarse porque los animales alimentados con HSD no presentan un aumento de la tensión arterial. En efecto, nuestros resultados, tras 5 semanas de dieta, no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los animales ND y HSD en la presión arterial, datos que concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores, incluso tras tiempos más prolongados de dieta o con dietas con una mayor proporción de sodio (Chen et al. 2009, Faraco et al. 2018, Ge Q. et al. 2017, Liu Y. Z. et al. 2014). Algunos autores proponen que, a pesar de no alterar la tensión arterial, la dieta HSD provoca otras alteraciones a nivel metabólico, como en la ingesta total de agua y comida, el peso corporal y en los niveles de glucosa en sangre, lo que apunta a que la dieta HSD tiene un impacto a nivel fisiológico en los animales, que puede estar mediando cambios a nivel cerebral, aunque los roedores parecen desarrollar algún mecanismo para compensar el aumento en la tensión arterial derivado de una alta ingesta de sal (Ge Q. et al. 2017).

Del mismo modo, en nuestro estudio tampoco se observan alteraciones en los niveles plasmáticos de sodio, resultado que también concuerda con lo obtenido por otros autores (Faraco et al. 2018). Esto puede ser debido a que la osmolaridad plasmática del sodio se encuentra altamente regulada, principalmente a nivel renal. Aumentos en sus niveles plasmáticos provocan una disminución de la reabsorción renal de sodio y un aumento de la reabsorción de agua. Esto resulta en una menor cantidad de orina excretada, con una mayor osmolaridad de sodio, manteniendo estables los niveles plasmáticos (Reynolds R. M. et al. 2006). En línea con lo anterior, se ha reportado un aumento de la cantidad de sodio presente en la orina en los animales HSD, sin cambios en la osmolaridad plasmática (Faraco et al. 2018).

5.2.5. El déficit de memoria en el test de condicionamiento al miedo contextual no es reversible tras un regreso a una dieta normal

Dado que los hábitos alimenticios son fácilmente modificables sin necesidad de recurrir a una terapia farmacológica, decidimos estudiar qué ocurre tras devolver a los animales a una dieta normal. Sorprendentemente, tras 5 semanas de dieta normal, a pesar de que los niveles de DCX vuelven a los valores del grupo ND, los animales que previamente se habían alimentado con HSD mantenían una menor respuesta de *freezing* en el test de condicionamiento al miedo contextual. Contrariamente a esto, se ha descrito cómo el déficit de memoria sí resulta reversible cuando se evalúa por medio del test de reconocimiento de nuevo objeto (Faraco et al. 2018).

La clave para interpretar estos resultados se encuentra en las características de cada uno de los tests empleados. En el caso del test de condicionamiento al miedo contextual, al tratarse de un protocolo retrógrado de memoria, el recuerdo es anterior a la dieta. Una menor respuesta de *freezing* tras la dieta HSD nos indica que no es posible recuperar esa memoria correctamente. Esto puede ser debido a un fallo en la consolidación del recuerdo, o bien a que se ha dañado el engrama correspondiente al mismo, impidiendo así el *retrieval*. Tras devolver a los animales HSD a una dieta normal, la recuperación de la respuesta neurogénica no posibilita que un recuerdo cuya codificación se realizó incorrectamente o cuyo engrama se ha perdido, pueda ser recuperado. En el test de reconocimiento de nuevo objeto, sin embargo, se utiliza un protocolo anterógrado de memoria, en el cual los animales vuelven a formar el recuerdo en el momento del test. En este caso, la recuperación de la neurogénesis en los animales HSD-ND sí posibilita que estos puedan volver a aprender y formar nuevos recuerdos, haciendo que el déficit de memoria sea reversible cuando se emplean protocolos anterógrados.

5.2.6. El receptor TLR4 participa en el déficit de memoria y las alteraciones hipocampales en el modelo HSD

Dado que nuestros resultados muestran que tanto la respuesta inflamatoria como la neurogénesis hipocampal se encuentran alteradas en la dieta HSD, el receptor TLR4 nos pareció un buen candidato que podría estar participando en los mecanismos responsables del deterioro cognitivo, ya que se encuentra implicado en ambos procesos (Akira et al. 2006, Rolls A. et al. 2007). En este sentido, encontramos que, al contrario de lo que sucede con los animales WT, los animales carentes del receptor TLR4 no presentan déficit de memoria tras 5 semanas de dieta HSD, del mismo modo que el descenso en las nuevas neuronas DCX⁺ tampoco se observa en estos animales.

A pesar de que no existe demasiada información al respecto, algunos datos apuntan a una relación entre el receptor TLR4 y la memoria. Así, los animales TLR4^{-/-} parecen obtener mejores resultados en el test de memoria espacial del laberinto de Morris que los correspondientes WT, así como una menor respuesta de *freezing* en protocolos anterógrados de condicionamiento auditivo. Estos resultados no se obtienen si se emplea un antagonista de TLR4 en lugar de animales TLR4^{-/-}, lo que apunta a un papel de TLR4 en la memoria durante el desarrollo (Okun et al. 2012). Además, el receptor TLR4 se encuentra expresado en los progenitores neurales y, por tanto, implicado en la respuesta neurogénica. Concretamente, TLR4 inhibe la proliferación de los progenitores neurales, encontrándose un mayor número de estas células en la ZSG en los animales TLR4^{-/-} con respecto a los WT, sin que esto suponga, sin embargo una mayor supervivencia neuronal (Rolls A. et al. 2007). Además, el receptor TLR4 se ha visto implicado en la respuesta neurogénica tras isquemia en la zona subventricular (Palma-Tortosa et al. 2019). Aunque no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los animales ND WT y TLR4^{-/-} en el número de neuroblastos, sí se observa una tendencia hacia un mayor número de células DCX⁺ en los animales TLR4^{-/-}. No puede, por tanto, descartarse la posibilidad de que la ausencia de

diferencias tanto en las tareas de memoria como en la neurogénesis en los animales TLR4^{-/-} tras una dieta HSD pueda ser debida, al menos en parte, por la existencia de diferentes mecanismos entre los animales TLR4^{-/-} y los WT.

Por otro lado, además de las propias implicaciones que el receptor TLR4 pueda tener en la respuesta neurogénica, los animales TLR4^{-/-} presentan una menor activación microglial en el hipocampo tras una dieta HSD que sus correspondientes controles WT. El receptor TLR4 se encuentra expresado en las células de microglía, siendo uno de los responsables de su activación, provocando la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Yao et al. 2013). En este sentido, nuestros resultados apuntan que la dieta HSD provoca una activación microglial en el hipocampo que se encuentra atenuada en animales carentes del receptor. Datos de otros autores parecen apuntar en la misma dirección. Concretamente, se ha descrito que, en ratas alimentadas con una dieta HSD, hay un aumento en la expresión del receptor TLR4 en el núcleo paraventricular talámico, acompañado de una mayor liberación de IL-1 β , IL-6 y TNF- α y un mayor estrés oxidativo. Estas alteraciones no se producen en presencia del antagonista de TLR4 TAK-242 (Wang M. L. et al. 2018b). A pesar de que en este estudio no se señala expresamente a la microglía como responsable, se encuentra documentada la activación microglial en esta región tras una dieta HSD (Gilman et al. 2019, Wang M. L. et al. 2018a). Una menor respuesta microglial en los animales carentes de TLR4 ha sido descrita en varios contextos (Fiebich et al. 2018), proponiéndose al receptor TLR4 como una posible diana terapéutica en el tratamiento de varias enfermedades neurodegenerativas (Lehnardt 2010).

Por tanto, nuestros datos demuestran la implicación del receptor TLR4 en la afectación hipocampal, tanto a nivel de neurogénesis como de memoria. Se requieren estudios adicionales utilizando animales inducibles condicionales de TLR4 para aclarar si la influencia es directa en los progenitores neurales, indirecta a través de la microglía y/o de origen periférico.

No obstante, como hemos comentado, en el contexto de la dieta HSD, se desconoce el ligando que pueda estar activando la célula diana, progenitor neural y/o microglía. En el caso del consumo de alcohol, se ha descrito que el etanol es capaz de activar directamente la microglía, una respuesta que es bloqueada en animales TLR4^{-/-} (Fernandez-Lizarbe et al. 2009). Sin embargo, en nuestro caso no encontramos una alteración en los niveles plasmáticos de sodio, por lo que parece poco probable que se trate de un efecto directo del sodio sobre el TLR4 microglial. Por otro lado, los ligandos capaces de activar la microglía podrían ser agonistas TLR4 liberados localmente, como sería el caso de los DAMPs como la proteína HMGB1, o también, en el marco del eje intestino cerebro, agonistas de origen periférico o incluso productos de la microbiota en relación con la disbiosis intestinal descrita como consecuencia de la dieta HSD (Miranda et al. 2018).

5.2.7. La dieta HSD provoca una respuesta inmune periférica dependiente de TLR4

Uno de los mecanismos de comunicación en el eje intestino-cerebro es la circulación sistémica, de forma que una respuesta inflamatoria periférica puede desencadenar fenómenos neuroinflamatorios. En general, se considera que los hábitos alimenticios tienen un profundo impacto en la homeostasis intestinal, asociándose el tipo de dieta occidental con alteraciones inflamatorias en la mucosa intestinal (Siracusa et al. 2018). En este sentido, existen cada vez mayores evidencias de que el consumo de sal provoca una respuesta inflamatoria a nivel intestinal, afectando al fenotipo de los linfocitos T CD4+ presentes en la lámina propia. Concretamente, varios autores han descrito un aumento en la frecuencia del fenotipo efector Th17, tanto en la lámina propia como en el bazo, en respuesta a una dieta HSD (Faraco et al. 2018, Wu et al. 2013) resultados que parecen ser replicables en estudios con humanos (Wilck et al. 2017). Esta expansión de los linfocitos Th17 se acompaña con un aumento en los niveles plasmáticos de la citoquina pro-inflamatoria IL-17, generándose así un estado inflamatorio sistémico en la línea del eje intestino-cerebro (Faraco et al. 2018).

En concordancia con lo descrito en la literatura, nuestros resultados en los animales WT muestran una fuerte tendencia hacia un aumento de la población de linfocitos Th17 en el bazo tras la dieta HSD, así como un aumento de los niveles plasmáticos de la citoquina IL-17. Los efectos deletéreos de la IL-17 son conocidos en el ámbito de las enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide o la encefalitis autoinmune experimental (EAE) (Gonzalez-Garcia et al. 2009, Komiyama et al. 2006), al igual que se le atribuye un probable papel vasotóxico (Kebir et al. 2007, Nguyen et al. 2013).

Dado que los linfocitos T CD4 expresan TLR4, y la expresión de este receptor es mayor en las células Th17 que en las otras subpoblaciones Th1 y Th2 (Reynolds J. M. et al. 2010), decidimos estudiar si una de las causas de la aparente resistencia de los animales TLR4^{-/-} a la dieta HSD podría ser una menor expansión de los linfocitos Th17. Sin embargo, nuestros resultados muestran que los animales TLR4^{-/-} alimentados con una dieta HSD presentan una mayor proporción de la población Th17 que los animales TLR4^{-/-} alimentados con una dieta ND, por lo que la expansión de los linfocitos Th17 en respuesta a la dieta HSD no es dependiente del receptor TLR4^{-/-}. Estos resultados parecen contradecir otros estudios en los que esta expansión sí es dependiente de TLR4 (Davila and Kolls 2010, Park J. H. et al. 2015). Sin embargo, estas discrepancias pueden deberse a que estos trabajos estudian la diferenciación tras estimular los linfocitos CD4 con un ligando directo de TLR4, como el LPS. Cabe por tanto la posibilidad de que la activación de TLR4 provoque la expansión de los linfocitos T CD4 hacia Th17, pero no sea condición necesaria, existiendo otras vías y receptores que conducen del mismo modo al fenotipo efector Th17, como pueden ser TLR2 o el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) (Quintana et al. 2008, Reynolds J. M. et al. 2010, Veldhoen et al. 2008).

Sin embargo, a pesar de que la dieta HSD provoca la expansión de los linfocitos Th17 en los animales TLR4^{-/-}, no se observa aumento en los niveles plasmáticos de IL-17 en estos animales. Esto nos indica que la ausencia de TLR4 atenúa la respuesta inmune periférica provocada por la dieta HSD, por medio de una disminución de la IL17 plasmática. Resultados similares se han obtenido en el campo de la EAE, donde se ha descrito que los animales TLR4^{-/-} no desarrollan los síntomas de la enfermedad, lo que se acompaña de unos menores niveles plasmáticos de IL17 (Reynolds J. M. et al. 2012, Zhang et al. 2019). Dado que se ha descrito que, por un lado, la depleción de IL-17 en animales alimentados con HSD revierte totalmente el fenotipo observado y, por otro lado, la administración de IL17 recombinante en animales alimentados con ND reproduce las alteraciones (Faraco et al. 2018), nuestros resultados concuerdan al indicar que la IL-17 es la responsable del fenotipo observado en los animales WT, siendo este revertido en los animales TLR4^{-/-} debido a una menor producción de IL-17.

5.2.8. Resumen de los posibles mecanismos implicados en el DCV en el modelo HSD

En el segundo objetivo de esta tesis doctoral hemos descrito que, al igual que en modelo BCCAs, tanto la neurogénesis hipocampal como la activación microglial podrían jugar un importante papel en el DCV asociado a la dieta HSD. El mecanismo propuesto, en conjunto con los datos disponibles en la literatura, consiste en una alteración de la respuesta inmune intestinal, que podría estar relacionada con una disbiosis de la microbiota, que provoca un aumento de la diferenciación de los linfocitos T hacia Th17. La producción de la citoquina IL-17 en estos linfocitos, dependiente del receptor TLR4, es la desencadenante de los fenómenos a nivel cerebral. El efecto sobre el endotelio vascular de la IL-17 provoca un fenómeno de hipoperfusión cerebral que conduce, al igual que en el modelo BCCAs, una activación microglial y una disminución de la neurogénesis hipocampal, responsables, al menos en parte, del deterioro cognitivo observado.



CONCLUSIONES

1. El modelo de hipoperfusión cerebral crónica inducido por estenosis bilateral de las arterias carótidas (BCCAS) induce déficits cognitivos que se manifiestan en protocolos anterógrados y retrógrados de evaluación de memoria episódica y contextual.
2. Dichos déficits no se asocian a cambios morfológicos hipocampales pero son concomitantes con un descenso en la respuesta neurogénica, que se manifiesta por un descenso en el número de neuroblastos en el giro dentado.
3. El modelo BCCAs provoca además una respuesta inflamatoria en el hipocampo, caracterizada por una progresiva activación microglial en el giro dentado y en la región CA1, así como un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Ambos eventos preceden al descenso neurogénico.
4. La dieta alta en sodio (HSD) provoca a su vez un déficit cognitivo, tampoco asociado a cambios morfológicos hipocampales, y también concomitante con una alteración de la respuesta neurogénica.
5. El déficit cognitivo inducido por la dieta alta en sodio y manifestado en protocolos retrógrados de evaluación de memoria episódica y contextual, se acompaña de un aumento en la proliferación de las células progenitoras NPCs tipo 1 que, sin embargo, no altera los niveles de NPCs tipo 2 y resulta finalmente en un descenso del número de neuroblastos.
6. Las alteraciones en la respuesta neurogénica en el modelo HSD son reversibles tras el regreso a una dieta normal, no así el déficit cognitivo en memoria episódica, manifestado en protocolos retrógrados, que es irreversible.
7. La dieta alta en sodio produce una respuesta inflamatoria en el hipocampo, caracterizada por una mayor activación microglial en el giro dentado y en la región CA1, además de una respuesta inflamatoria periférica, que se evidencia en un aumento de la población de linfocitos TH17, así como un aumento de la citoquina proinflamatoria IL-17.
8. Los animales carentes del receptor TLR4 no presentan las alteraciones cognitivas ni los cambios en la fisiología del hipocampo desarrollados por los animales WT tras la dieta alta en sodio, lo que demuestra la implicación de este receptor en los trastornos que presenta este modelo.
9. Asimismo, la producción de la citoquina IL-17 se encuentra impedida en los animales carentes de TLR4, no desarrollando la respuesta inmune periférica desencadenante de las alteraciones a nivel cerebral derivadas de la dieta HSD.

10. Nuestros resultados apuntan a que tanto la neurogénesis hipocampal como la activación microglial, así como la activación del receptor TLR4, son posibles dianas terapéuticas para el tratamiento del DCV.



BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Haq R**, Schlachetzki JCM, Glass CK, Mazmanian SK. 2019. Microbiome-microglia connections via the gut-brain axis. *J Exp Med* 216:41-59.
- Ait-Belgnaoui A**, Colom A, Braniste V, Ramalho L, Marrot A, Cartier C, Houdeau E, Theodorou V, Tompkins T. 2014. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterol Motil* 26:510-520.
- Akbaraly TN**, Brunner EJ, Ferrie JE, Marmot MG, Kivimaki M, Singh-Manoux A. 2009. Dietary pattern and depressive symptoms in middle age. *Br J Psychiatry* 195:408-413.
- Akira S**, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Altman J**. 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127-1128.
- Antunes M**, Biala G. 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13:93-110.
- Aparicio A**, Rodriguez-Rodriguez E, Cuadrado-Soto E, Navia B, Lopez-Sobaler AM, Ortega RM. 2017. Estimation of salt intake assessed by urinary excretion of sodium over 24 h in Spanish subjects aged 7-11 years. *Eur J Nutr* 56:171-178.
- Arias N**, Mendez M, Arias JL. 2015. The importance of the context in the hippocampus and brain related areas throughout the performance of a fear conditioning task. *Hippocampus* 25:1242-1249.
- Assaf Y**, Pasternak O. 2008. Diffusion tensor imaging (DTI)-based white matter mapping in brain research: a review. *J Mol Neurosci* 34:51-61.
- Attwell D**, Iadecola C. 2002. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci* 25:621-625.
- Baumgart M**, Snyder HM, Carrillo MC, Fazio S, Kim H, Johns H. 2015. Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimers Dement* 11:718-726.
- Ben-Ari H**, Lifschytz T, Wolf G, Rigbi A, Blumenfeld-Katzir T, Merzel TK, Koroukhov N, Lotan A, Lerer B. 2019. White matter lesions, cerebral inflammation and cognitive function in a mouse model of cerebral hypoperfusion. *Brain Res* 1711:193-201.
- Ben-Yakov A**, Dudai Y, Mayford MR. 2015. Memory Retrieval in Mice and Men. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- Benakis C**, et al. 2016. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal gammadelta T cells. *Nat Med* 22:516-523.
- Bernier BE**, Lacagnina AF, Ayoub A, Shue F, Zemelman BV, Krasne FB, Drew MR. 2017. Dentate Gyrus Contributes to Retrieval as well as Encoding: Evidence from Context Fear Conditioning, Recall, and Extinction. *J Neurosci* 37:6359-6371.
- Bertram L**, Tanzi RE. 2008. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* 9:768-778.
- Bizzozero G**. 1893. Accrescimento e rigenerazione nell'organismo. *Archivio per le Scienze Mediche*. Torino: Minerva Medica.
- Blinder P**, Tsai PS, Kaufhold JP, Knutsen PM, Suhl H, Kleinfeld D. 2013. The cortical angiome: an interconnected vascular network with noncolumnar patterns of blood flow. *Nat Neurosci* 16:889-897.
- Block ML**, Zecca L, Hong JS. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.
- Boehm-Sturm P**, et al. 2017. Neuroimaging Biomarkers Predict Brain Structural Connectivity Change in a Mouse Model of Vascular Cognitive Impairment. *Stroke* 48:468-475.
- Boldrini M**, et al. 2018. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22:589-599 e585.
- Bonaguidi MA**, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, Song H. 2011. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell* 145:1142-1155.

- Borsini A**, Zunszain PA, Thuret S, Pariante CM. 2015. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci* 38:145-157.
- Bowler JV**. 2007. Modern concept of vascular cognitive impairment. *Br Med Bull* 83:291-305.
- Bradford MM**. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bravo JA**, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF. 2011. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16050-16055.
- Bruel-Jungerman E**, Rampon C, Laroche S. 2007. Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci* 18:93-114.
- Cagnin A**, Rossor M, Sampson EL, Mackinnon T, Banati RB. 2004. In vivo detection of microglial activation in frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 56:894-897.
- Cancino GI**, Yiu AP, Fatt MP, Dugani CB, Flores ER, Frankland PW, Josselyn SA, Miller FD, Kaplan DR. 2013. p63 Regulates adult neural precursor and newly born neuron survival to control hippocampal-dependent Behavior. *J Neurosci* 33:12569-12585.
- Candelario-Jalil E**, Thompson J, Taheri S, Grossetete M, Adair JC, Edmonds E, Prestopnik J, Wills J, Rosenberg GA. 2011. Matrix metalloproteinases are associated with increased blood-brain barrier opening in vascular cognitive impairment. *Stroke* 42:1345-1350.
- Carey AN**, Gildawie KR, Rovnak A, Thangthaeng N, Fisher DR, Shukitt-Hale B. 2019. Blueberry supplementation attenuates microglia activation and increases neuroplasticity in mice consuming a high-fat diet. *Nutr Neurosci* 22:253-263.
- Carter RJ**, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ. 1999. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 19:3248-3257.
- Caso JR**, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I. 2007. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115:1599-1608.
- Chen D**, La Greca L, Head GA, Walther T, Mayorov DN. 2009. Blood pressure reactivity to emotional stress is reduced in AT1A-receptor knockout mice on normal, but not high salt intake. *Hypertens Res* 32:559-564.
- Cherry JD**, Olschowka JA, O'Banion MK. 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* 11:98.
- Chugh G**, Asghar M, Patki G, Bohat R, Jafri F, Allam F, Dao AT, Mowrey C, Alkadhi K, Salim S. 2013. A high-salt diet further impairs age-associated declines in cognitive, behavioral, and cardiovascular functions in male Fischer brown Norway rats. *J Nutr* 143:1406-1413.
- Clark RE**, Squire LR. 2013. Similarity in form and function of the hippocampus in rodents, monkeys, and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 Suppl 2:10365-10370.
- Clarke G**, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. 2013. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry* 18:666-673.
- Colucci-D'Amato L**, Bonavita V, di Porzio U. 2006. The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. *Neurol Sci* 27:266-270.
- Crews L**, Rockenstein E, Masliah E. 2010. APP transgenic modeling of Alzheimer's disease: mechanisms of neurodegeneration and aberrant neurogenesis. *Brain Struct Funct* 214:111-126.
- Cuartero MI**, et al. 2019. Abolition of aberrant neurogenesis ameliorates cognitive impairment after stroke in mice. *J Clin Invest*.
- Curzon P**, Rustay NR, Browman KE. 2009. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents in nd, Buccafusco JJ, eds. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Boca Raton (FL).
- D'Hooge R**, De Deyn PP. 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 36:60-90.

- Dalmau I**, Vela JM, Gonzalez B, Finsen B, Castellano B. 2003. Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 458:144-157.
- Darsalia V**, Heldmann U, Lindvall O, Kokaia Z. 2005. Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke* 36:1790-1795.
- Davila E**, Kolls J. 2010. A "Toll" for Th17 cell expansion. *J Leukoc Biol* 88:5-7.
- de Weerd M, Greving JP, Hedblad B, Lorenz MW, Mathiesen EB, O'Leary DH, Rosvall M, Sitzer M, Buskens E, Bots ML. 2010. Prevalence of asymptomatic carotid artery stenosis in the general population: an individual participant data meta-analysis. *Stroke* 41:1294-1297.
- Deng W**, Aimone JB, Gage FH. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339-350.
- Dere E**, Easton A., Nadel L. 2008. *Handbook of Episodic Memory*. Elsevier.
- Desbonnet L**, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. 2014. Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol Psychiatry* 19:146-148.
- Diaz Heijtz R**, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, Hibberd ML, Forssberg H, Pettersson S. 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3047-3052.
- Dinel AL**, Joffre C, Trifilieff P, Aubert A, Foury A, Le Ruyet P, Laye S. 2014. Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. *J Neuroinflammation* 11:155.
- Do-Monte FH**, Quinones-Laracuente K, Quirk GJ. 2015. A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. *Nature* 519:460-463.
- Do Monte FH**, Quirk GJ, Li B, Penzo MA. 2016. Retrieving fear memories, as time goes by. *Mol Psychiatry* 21:1027-1036.
- Donovan MH**, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ. 2006. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 495:70-83.
- Dorr A**, Sled JG, Kabani N. 2007. Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *Neuroimage* 35:1409-1423.
- Drew MR**, Huckleberry KA. 2017. Modulation of Aversive Memory by Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neurotherapeutics* 14:646-661.
- Du L**, Zhang Y, Chen Y, Zhu J, Yang Y, Zhang HL. 2017. Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Mol Neurobiol* 54:7567-7584.
- Duan W**, Ran H, Zhou Z, He Q, Zheng J. 2012. Adenosine A2A receptor deficiency up-regulates cystatin F expression in white matter lesions induced by chronic cerebral hypoperfusion. *PLoS One* 7:e52566.
- Ducroux C**, et al. 2018. Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 49:754-757.
- Dudai Y**. 2004. *Memory from A to Z: Keywords Concepts and Beyond*. Oxford University Press.
- Elliott P**. 2006. *Sodium Intakes Around the World*.
- Encinas JM**, Enikolopov G. 2008. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol* 85:243-272.
- Encinas JM**, Vaahtokari A, Enikolopov G. 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8233-8238.
- Eriksson PS**, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Erny D**, et al. 2015. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 18:965-977.
- Esiri MM**, Nagy Z, Smith MZ, Barnettson L, Smith AD. 1999. Cerebrovascular disease and threshold for dementia in the early stages of Alzheimer's disease. *Lancet* 354:919-920.

- Esposito MS**, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25:10074-10086.
- Evensel A**, Ceylan ME. 2015. The Gut-Brain Axis: The Missing Link in Depression. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 13:239-244.
- Faraco G**, et al. 2018. Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response. *Nat Neurosci* 21:240-249.
- Fernandez G**, et al. 2018. TLR4-Binding DNA Aptamers Show a Protective Effect against Acute Stroke in Animal Models. *Mol Ther* 26:2047-2059.
- Fernandez-Lizarbe S**, Pascual M, Guerri C. 2009. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol* 183:4733-4744.
- Fiebich BL**, Batista CRA, Saliba SW, Yousif NM, de Oliveira ACP. 2018. Role of Microglia TLRs in Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 12:329.
- Fiocco AJ**, Shatenstein B, Ferland G, Payette H, Belleville S, Kergoat MJ, Morais JA, Greenwood CE. 2012. Sodium intake and physical activity impact cognitive maintenance in older adults: the NuAge Study. *Neurobiol Aging* 33:829 e821-828.
- Forbes D**, Forbes S, Morgan DG, Markle-Reid M, Wood J, Culum I. 2008. Physical activity programs for persons with dementia. *Cochrane Database Syst Rev*:CD006489.
- Freemantle E**, Vandal M, Tremblay-Mercier J, Tremblay S, Blachere JC, Begin ME, Brenna JT, Windust A, Cunnane SC. 2006. Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:213-220.
- Fuchtemeier M**, Brinckmann MP, Foddiss M, Kunz A, Po C, Curato C, Dirnagl U, Farr TD. 2015. Vascular change and opposing effects of the angiotensin type 2 receptor in a mouse model of vascular cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab* 35:476-484.
- Garcia-Culebras A**, Duran-Laforet V, Pena-Martinez C, Ballesteros I, Pradillo JM, Diaz-Guzman J, Lizasoain I, Moro MA. 2018. Myeloid cells as therapeutic targets in neuroinflammation after stroke: Specific roles of neutrophils and neutrophil-platelet interactions. *J Cereb Blood Flow Metab* 38:2150-2164.
- Ge Q**, Wang Z, Wu Y, Huo Q, Qian Z, Tian Z, Ren W, Zhang X, Han J. 2017. High salt diet impairs memory-related synaptic plasticity via increased oxidative stress and suppressed synaptic protein expression. *Mol Nutr Food Res* 61.
- Ge S**, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. 2007. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54:559-566.
- Geng J**, et al. 2018. Blood-Brain Barrier Disruption Induced Cognitive Impairment Is Associated With Increase of Inflammatory Cytokine. *Front Aging Neurosci* 10:129.
- Gerhard A**, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ. 2006. In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 21:404-412.
- Gill R**, Tsung A, Billiar T. 2010. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med* 48:1121-1132.
- Gillette-Guyonnet S**, Vellas B. 2008. Caloric restriction and brain function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11:686-692.
- Gilman TL**, Mitchell NC, Daws LC, Toney GM. 2019. Neuroinflammation Contributes to High Salt Intake-Augmented Neuronal Activation and Active Coping Responses to Acute Stress. *Int J Neuropsychopharmacol* 22:137-142.
- Gomez-Pinilla F**. 2008. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat Rev Neurosci* 9:568-578.
- Gonzalez-Garcia I**, Zhao Y, Ju S, Gu Q, Liu L, Kolls JK, Lu B. 2009. IL-17 signaling-independent central nervous system autoimmunity is negatively regulated by TGF-beta. *J Immunol* 182:2665-2671.

- Gorelick PB**, et al. 2011. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke* 42:2672-2713.
- Graudal N**, Jurgens G, Baslund B, Alderman MH. 2014. Compared with usual sodium intake, low- and excessive-sodium diets are associated with increased mortality: a meta-analysis. *Am J Hypertens* 27:1129-1137.
- Gu Y**, Scarmeas N. 2011. Dietary patterns in Alzheimer's disease and cognitive aging. *Curr Alzheimer Res* 8:510-519.
- Han MH**, Lee EH, Koh SH. 2016. Current Opinion on the Role of Neurogenesis in the Therapeutic Strategies for Alzheimer Disease, Parkinson Disease, and Ischemic Stroke; Considering Neuronal Voiding Function. *Int Neurourol J* 20:276-287.
- Han TK**, Leem YH, Kim HS. 2019. Treadmill exercise restores high fat diet-induced disturbance of hippocampal neurogenesis through beta2-adrenergic receptor-dependent induction of thioredoxin-1 and brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res* 1707:154-163.
- Hanke ML**, Kielian T. 2011. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* 121:367-387.
- Hao J**, Chen Y, Yao E, Liu X. 2018. Soluble epoxide hydrolase inhibition alleviated cognitive impairments via NRG1/ErbB4 signaling after chronic cerebral hypoperfusion induced by bilateral carotid artery stenosis in mice. *Brain Res* 1699:89-99.
- Hase Y**, et al. 2018. The effects of environmental enrichment on white matter pathology in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 38:151-165.
- Hernandez-Jimenez M**, Pena-Martinez C, Godino MDC, Diaz-Guzman J, Moro MA, Lizasoain I. 2017. Test repositioning for functional assessment of neurological outcome after experimental stroke in mice. *PLoS One* 12:e0176770.
- Holland PR**, et al. 2011. MRI is a sensitive marker of subtle white matter pathology in hypoperfused mice. *Neurobiol Aging* 32:2325 e2321-2326.
- Holland PR**, et al. 2015. Gliovascular disruption and cognitive deficits in a mouse model with features of small vessel disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 35:1005-1014.
- Hooper LV**, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291:881-884.
- Hopfield JJ**. 1982. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:2554-2558.
- Hou X**, Liang X, Chen JF, Zheng J. 2015. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is involved in chronic cerebral hypoperfusion-induced white matter lesions and cognitive impairment by regulating glial cell activation and pro-inflammatory cytokines. *Neuroscience* 297:118-126.
- Hu M**, Liu Z, Lv P, Wang H, Zhu Y, Qi Q, Xu J, Gao L. 2017. Nimodipine activates neuroprotective signaling events and inactivates autophages in the VCID rat hippocampus. *Neurol Res* 39:904-909.
- Iadecola C**. 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:347-360.
- . 2013. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* 80:844-866.
- Jacka FN**, Kremer PJ, Berk M, de Silva-Sanigorski AM, Moodie M, Leslie ER, Pasco JA, Swinburn BA. 2011. A prospective study of diet quality and mental health in adolescents. *PLoS One* 6:e24805.
- Jacka FN**, Pasco JA, Mykletun A, Williams LJ, Hodge AM, O'Reilly SL, Nicholson GC, Kotowicz MA, Berk M. 2010. Association of Western and traditional diets with depression and anxiety in women. *Am J Psychiatry* 167:305-311.
- Jiwa NS**, Garrard P, Hainsworth AH. 2010. Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review. *J Neurochem* 115:814-828.
- Jones MW**. 2002. A comparative review of rodent prefrontal cortex and working memory. *Curr Mol Med* 2:639-647.

- Kanoski SE**, Davidson TL. 2011. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav* 103:59-68.
- Kaplan MS**, Bell DH. 1984. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 4:1429-1441.
- Kaplan MS**, Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Kawai T**, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384.
- Kebir H**, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13:1173-1175.
- Kempermann G**. 2019. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nat Rev Neurosci* 20:235-245.
- Kempermann G**, et al. 2018. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell* 23:25-30.
- Kempermann G**, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447-452.
- Kendig MD**, Morris MJ. 2019. Reviewing the effects of dietary salt on cognition: mechanisms and future directions. *Asia Pac J Clin Nutr* 28:6-14.
- Kettenmann H**, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.
- Kety SS**. 1950. Circulation and metabolism of the human brain in health and disease. *Am J Med* 8:205-217.
- Kinney JW**, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. 2018. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)* 4:575-590.
- Knight EM**, Martins IV, Gumusgoz S, Allan SM, Lawrence CB. 2014. High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. *Neurobiol Aging* 35:1821-1832.
- Komiyama Y**, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177:566-573.
- Lamanna A**, Maingard J, Barras C, Kok HK, Handelman G, Chandra RV, Thijs V, Brooks DM, Asadi H. 2019. Carotid Artery Stenting: Current State of Evidence and Future Directions. *Acta Neurol Scand*.
- Larson EB**, Wang L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Crane P, Kukull W. 2006. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med* 144:73-81.
- Leardini-Tristao M**, Borges JP, Freitas F, Rangel R, Daliry A, Tibirica E, Estado V. 2017. The impact of early aerobic exercise on brain microvascular alterations induced by cerebral hypoperfusion. *Brain Res* 1657:43-51.
- Lee S**, Kim DH, Lee DH, Jeon SJ, Lee CH, Son KH, Jung JW, Shin CY, Ryu JH. 2010. Oroxylin A, a flavonoid, stimulates adult neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus region of mice. *Neurochem Res* 35:1725-1732.
- Lehnardt S**. 2010. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58:253-263.
- Li WZ**, Wu WY, Huang H, Wu YY, Yin YY. 2013. Protective effect of bilobalide on learning and memory impairment in rats with vascular dementia. *Mol Med Rep* 8:935-941.
- Li XM**, Zhou MT, Wang XM, Ji MH, Zhou ZQ, Yang JJ. 2014. Resveratrol pretreatment attenuates the isoflurane-induced cognitive impairment through its anti-inflammation and -apoptosis actions in aged mice. *J Mol Neurosci* 52:286-293.

- Lim SL**, Rodriguez-Ortiz CJ, Kitazawa M. 2015. Infection, systemic inflammation, and Alzheimer's disease. *Microbes Infect* 17:549-556.
- Lindqvist A**, Mohapel P, Bouter B, Frielingsdorf H, Pizzo D, Brundin P, Erlanson-Albertsson C. 2006. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur J Neurol* 13:1385-1388.
- Liu H**, Zhang J. 2012. Cerebral hypoperfusion and cognitive impairment: the pathogenic role of vascular oxidative stress. *Int J Neurosci* 122:494-499.
- Liu Q**, Radwanski R, Babadjouni R, Patel A, Hodis DM, Baumbacher P, Zhao Z, Zlokovic B, Mack WJ. 2019. Experimental chronic cerebral hypoperfusion results in decreased pericyte coverage and increased blood-brain barrier permeability in the corpus callosum. *J Cereb Blood Flow Metab* 39:240-250.
- Liu YZ**, Chen JK, Li ZP, Zhao T, Ni M, Li DJ, Jiang CL, Shen FM. 2014. High-salt diet enhances hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in mice. *Neurobiol Learn Mem* 114:10-15.
- Llorens-Martin M**, Fuster-Matanzo A, Teixeira CM, Jurado-Arjona J, Ulloa F, Defelipe J, Rabano A, Hernandez F, Soriano E, Avila J. 2013. GSK-3beta overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo. *Mol Psychiatry* 18:451-460.
- Lucassen PJ**, Oomen CA, Naninck EF, Fitzsimons CP, van Dam AM, Czeh B, Korosi A. 2015. Regulation of Adult Neurogenesis and Plasticity by (Early) Stress, Glucocorticoids, and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a021303.
- Luong TN**, Carlisle HJ, Southwell A, Patterson PH. 2011. Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *J Vis Exp*.
- 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* 8:2050-2059.
- Maiti P**, Manna J, Dunbar GL. 2017. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Transl Neurodegener* 6:28.
- Maki T**, et al. 2011. Angiogenic and vasoprotective effects of adrenomedullin on prevention of cognitive decline after chronic cerebral hypoperfusion in mice. *Stroke* 42:1122-1128.
- Malko P**, Syed Mortadza SA, McWilliam J, Jiang LH. 2019. TRPM2 Channel in Microglia as a New Player in Neuroinflammation Associated With a Spectrum of Central Nervous System Pathologies. *Front Pharmacol* 10:239.
- Manavalan B**, Basith S, Choi S. 2011. Similar Structures but Different Roles - An Updated Perspective on TLR Structures. *Front Physiol* 2:41.
- Marshall RS**. 2012. Effects of altered cerebral hemodynamics on cognitive function. *J Alzheimers Dis* 32:633-642.
- Marshall RS**, et al. 2012. Cerebral hemodynamics and cognitive impairment: baseline data from the RECON trial. *Neurology* 78:250-255.
- Marshall RS**, Lazar RM, Mohr JP, Pile-Spellman J, Hacein-Bey L, Duong DH, Joshi S, Chen X, Levin B, Young WL. 1999. Higher cerebral function and hemispheric blood flow during awake carotid artery balloon test occlusions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:734-738.
- Martins IV**, Rivers-Auty J, Allan SM, Lawrence CB. 2017. Mitochondrial Abnormalities and Synaptic Loss Underlie Memory Deficits Seen in Mouse Models of Obesity and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 55:915-932.
- Matus-Amat P**, Higgins EA, Barrientos RM, Rudy JW. 2004. The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *J Neurosci* 24:2431-2439.
- Mayer EA**, Knight R, Mazmanian SK, Cryan JF, Tillisch K. 2014. Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci* 34:15490-15496.
- McLean FH**, Grant C, Morris AC, Horgan GW, Polanski AJ, Allan K, Campbell FM, Langston RF, Williams LM. 2018. Rapid and reversible impairment of episodic memory by a high-fat diet in mice. *Sci Rep* 8:11976.
- Mente A**, et al. 2018. Urinary sodium excretion, blood pressure, cardiovascular disease, and mortality: a community-level prospective epidemiological cohort study. *Lancet* 392:496-506.

- Mente A**, O'Donnell MJ, Yusuf S. 2016. Sodium and cardiovascular disease - Authors' reply. *Lancet* 388:2113-2114.
- Michaud JP**, et al. 2013. Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer's disease-related pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:1941-1946.
- Michel RP**, Cruz-Orive LM. 1988. Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. *J Microsc* 150:117-136.
- Miller DI**, Taler V, Davidson PS, Messier C. 2012. Measuring the impact of exercise on cognitive aging: methodological issues. *Neurobiol Aging* 33:622 e629-643.
- Miranda PM**, De Palma G, Serkis V, Lu J, Louis-Auguste MP, McCarville JL, Verdu EF, Collins SM, Bercik P. 2018. High salt diet exacerbates colitis in mice by decreasing *Lactobacillus* levels and butyrate production. *Microbiome* 6:57.
- Miyanojara J**, Kakae M, Nagayasu K, Nakagawa T, Mori Y, Arai K, Shirakawa H, Kaneko S. 2018. TRPM2 Channel Aggravates CNS Inflammation and Cognitive Impairment via Activation of Microglia in Chronic Cerebral Hypoperfusion. *J Neurosci* 38:3520-3533.
- Moreno-Jimenez EP**, Flor-Garcia M, Terreros-Roncal J, Rabano A, Cafini F, Pallas-Bazarrá N, Avila J, Llorens-Martin M. 2019. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med* 25:554-560.
- Moriya J**, Chen R, Yamakawa J, Sasaki K, Ishigaki Y, Takahashi T. 2011. Resveratrol improves hippocampal atrophy in chronic fatigue mice by enhancing neurogenesis and inhibiting apoptosis of granular cells. *Biol Pharm Bull* 34:354-359.
- Mozaffarian D**, et al. 2014. Global sodium consumption and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 371:624-634.
- Murai T**, Okuda S, Tanaka T, Ohta H. 2007. Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. *Physiol Behav* 90:116-124.
- Nanri A**, Kimura Y, Matsushita Y, Ohta M, Sato M, Mishima N, Sasaki S, Mizoue T. 2010. Dietary patterns and depressive symptoms among Japanese men and women. *Eur J Clin Nutr* 64:832-839.
- Nation DA**, et al. 2019. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat Med* 25:270-276.
- Neghlig A**. 1996. Metabolism of the central nervous system. Pages 177–196 in Mraovitch S SR, ed. *Neurophysiological basis of cerebral blood flow control: an introduction*. . London: John Libby
- Neufeld KM**, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. 2011. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil* 23:255-264, e119.
- Nguyen H**, Chiasson VL, Chatterjee P, Kopriva SE, Young KJ, Mitchell BM. 2013. Interleukin-17 causes Rho-kinase-mediated endothelial dysfunction and hypertension. *Cardiovasc Res* 97:696-704.
- Nishio K**, et al. 2010. A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* 41:1278-1284.
- Noble EE**, Mavanji V, Little MR, Billington CJ, Kotz CM, Wang C. 2014. Exercise reduces diet-induced cognitive decline and increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor in CA3 neurons. *Neurobiol Learn Mem* 114:40-50.
- Nordengen K**, et al. 2019. Glial activation and inflammation along the Alzheimer's disease continuum. *J Neuroinflammation* 16:46.
- O'Donnell M**, Mente A, Yusuf S. 2015. Sodium intake and cardiovascular health. *Circ Res* 116:1046-1057.
- Ocampo AC**, Squire LR, Clark RE. 2017. Hippocampal area CA1 and remote memory in rats. *Learn Mem* 24:563-568.

- Ohtomo R**, Bannai T, Ohtomo G, Shindo A, Tomimoto H, Tsuji S, Iwata A. 2018. Cilostazol alleviates white matter degeneration caused by chronic cerebral hypoperfusion in mice: Implication of its mechanism from gene expression analysis. *Neurosci Lett* 662:247-252.
- Okun E**, et al. 2012. Evidence for a developmental role for TLR4 in learning and memory. *PLoS One* 7:e47522.
- OMS** (2017) Demencia. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Consultado el 8-1-2019.
- Orgogozo JM**, Rigaud AS, Stoffler A, Mobius HJ, Forette F. 2002. Efficacy and safety of memantine in patients with mild to moderate vascular dementia: a randomized, placebo-controlled trial (MMM 300). *Stroke* 33:1834-1839.
- Palmer TD**, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH. 2001. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 411:42-43.
- Park HR**, Park M, Choi J, Park KY, Chung HY, Lee J. 2010. A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett* 482:235-239.
- Park JH**, Jeong SY, Choi AJ, Kim SJ. 2015. Lipopolysaccharide directly stimulates Th17 differentiation in vitro modulating phosphorylation of RelB and NF-kappaB1. *Immunol Lett* 165:10-19.
- Park JH**, Young Park H, Lee HS, Han CY, Lee S. 2019a. Effects of alpha-lipoic acid on chronic cerebrovascular hypoperfusion in an animal model of vascular dementia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23:2587-2595.
- Park SY**, Kim HY, Lee YS, Heo HJ, Shin HK, Lee WS, Hong KW, Kim CD. 2019b. Augmented improvement of cognition and memory by aripiprazole add-on for cilostazol treatment in the chronic cerebral hypoperfusion mouse model. *Behav Brain Res* 365:133-140.
- Plaza-Zabala A**, Sierra-Torre V, Sierra A. 2017. Autophagy and Microglia: Novel Partners in Neurodegeneration and Aging. *Int J Mol Sci* 18.
- Patel A**, et al. 2017. Chronic cerebral hypoperfusion induced by bilateral carotid artery stenosis causes selective recognition impairment in adult mice. *Neurol Res* 39:910-917.
- Paxinos G**, Franklin K (2001) *The Mouse Brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, California 92101-4495, USA.
- Perry VH**. 2004. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun* 18:407-413.
- Plate KH**. 1999. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:313-320.
- Porsolt RD**, Brossard G, Hautbois C, Roux S. 2001. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit 8 10A.
- Qin L**, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55:453-462.
- Quintana FJ**, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL. 2008. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453:65-71.
- Ramirez AI**, de Hoz R, Salobarra-Garcia E, Salazar JJ, Rojas B, Ajoy D, Lopez-Cuenca I, Rojas P, Trivino A, Ramirez JM. 2017. The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma. *Front Aging Neurosci* 9:214.

- Ramon y Cajal S.** 1913-1914. Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Madrid: Moya.
- Reimer MM,** et al. 2011. Rapid disruption of axon-glia integrity in response to mild cerebral hypoperfusion. *J Neurosci* 31:18185-18194.
- Rendeiro C,** Spencer JP, Vauzour D, Butler LT, Ellis JA, Williams CM. 2009. The impact of flavonoids on spatial memory in rodents: from behaviour to underlying hippocampal mechanisms. *Genes Nutr* 4:251-270.
- Reynolds JM,** Martinez GJ, Chung Y, Dong C. 2012. Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:13064-13069.
- Reynolds JM,** et al. 2010. Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity* 32:692-702.
- Reynolds RM,** Padfield PL, Seckl JR. 2006. Disorders of sodium balance. *BMJ* 332:702-705.
- Sarikonda KV, Watson RE, Opara OC, Dipette DJ. 2009. Experimental animal models of hypertension. *J Am Soc Hypertens* 3:158-165.
- Rio-Hortega.** 1932. Microglia in Penfield W, ed. *Cellular Pathology of the Nervous System*.
- Roberts JM,** Maniskas ME, Bix GJ. 2018. Bilateral carotid artery stenosis causes unexpected early changes in brain extracellular matrix and blood-brain barrier integrity in mice. *PLoS One* 13:e0195765.
- Rodriguez JJ,** Jones VC, Tabuchi M, Allan SM, Knight EM, LaFerla FM, Oddo S, Verkhratsky A. 2008. Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 3:e2935.
- Rolls A,** Shechter R, London A, Ziv Y, Ronen A, Levy R, Schwartz M. 2007. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol* 9:1081-1088.
- Rolls ET.** 1996. A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus* 6:601-620.
- Roman GC,** Erkinjuntti T, Wallin A, Pantoni L, Chui HC. 2002. Subcortical ischaemic vascular dementia. *Lancet Neurol* 1:426-436.
- Rovio S,** Kareholt I, Helkala EL, Viitanen M, Winblad B, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A, Kivipelto M. 2005. Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 4:705-711.
- Sanchez-Villegas A,** Delgado-Rodriguez M, Alonso A, Schlatter J, Lahortiga F, Serra Majem L, **Martinez-Gonzalez MA.** 2009. Association of the Mediterranean dietary pattern with the incidence of depression: the Seguimiento Universidad de Navarra/University of Navarra follow-up (SUN) cohort. *Arch Gen Psychiatry* 66:1090-1098.
- Salter MW,** Stevens B. 2017. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23:1018-1027.
- Sampson TR,** et al. 2016. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* 167:1469-1480 e1412.
- Scaffidi P,** Misteli T, Bianchi ME. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418:191-195.
- Schafer DP,** Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, **Greenberg ME,** Barres BA, Stevens B. 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691-705.
- 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* 35:2598-2603.
- Shibata M,** Yamasaki N, Miyakawa T, Kalaria RN, Fujita Y, Ohtani R, Ihara M, Takahashi R, **Tomimoto H.** 2007. Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 38:2826-2832.
- Shin JW,** Kweon KJ, Kim DK, Kim P, Jeon TD, Maeng S, Sohn NW. 2018. Scutellarin Ameliorates Learning and Memory Deficit via Suppressing beta-Amyloid Formation and Microglial Activation in Rats with Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Am J Chin Med* 46:1203-1223.

- Sierra A**, Abiega O, Shahraz A, Neumann H. 2013. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci* 7:6.
- Sierra A**, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Encinas JM, Comeau S, Tremblay ME. 2014. Surveillance, phagocytosis, and inflammation: how never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. *Neural Plast* 2014:610343.
- Sierra A**, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7:483-495.
- Sierra A**, et al. 2015. Neuronal hyperactivity accelerates depletion of neural stem cells and impairs hippocampal neurogenesis. *Cell Stem Cell* 16:488-503.
- Simon P**, Dupuis R, Costentin J. 1994. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav Brain Res* 61:59-64.
- Siracusa F**, Schaltenberg N, Villablanca EJ, Huber S, Gagliani N. 2018. Dietary Habits and Intestinal Immunity: From Food Intake to CD4(+) T H Cells. *Front Immunol* 9:3177.
- Smirnova I**, Poltorak A, Chan EK, McBride C, Beutler B. 2000. Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor 4 locus (TLR4). *Genome Biol* 1:RESEARCH002.
- Snowdon DA**, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA, Markesbery WR. 1997. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study. *JAMA* 277:813-817.
- Solfrizzi V**, et al. 2011. Mediterranean diet in predementia and dementia syndromes. *Curr Alzheimer Res* 8:520-542.
- Song M**, Jin J, Lim JE, Kou J, Pattanayak A, Rehman JA, Kim HD, Tahara K, Lalonde R, Fukuchi K. 2011. TLR4 mutation reduces microglial activation, increases Abeta deposits and exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 8:92.
- Sorrells SF**, et al. 2018. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555:377-381.
- Squire LR**, Genzel L, Wixted JT, Morris RG. 2015. Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a021766.
- Stranahan AM**, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, Mattson MP. 2008. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 18:1085-1088.
- Su SH**, Wu YF, Lin Q, Hai J. 2017. Cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 and fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 ameliorate neuroinflammatory responses in chronic cerebral hypoperfusion model by blocking NF-kappaB pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 390:1189-1200.
- Subramaniam SR**, Federoff HJ. 2017. Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 9:176.
- Sudo N**, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, Kubo C, Koga Y. 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 558:263-275.
- Sun T**, et al. 2018. Activation of liver X receptor beta-enhancing neurogenesis ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion. *Exp Neurol* 304:21-29.
- Tahara K**, Kim HD, Jin JJ, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K. 2006. Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance. *Brain* 129:3006-3019.
- Takata K**, Kitamura Y, Kakimura J, Shibagaki K, Tsuchiya D, Taniguchi T, Smith MA, Perry G, Shimohama S. 2003. Role of high mobility group protein-1 (HMG1) in amyloid-beta homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 301:699-703.
- Takeda K**, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
- Takeuchi O**, Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805-820.
- Tang Y**, Le W. 2016. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53:1181-1194.

- Tatemichi TK**, Desmond DW, Prohovnik I, Eidelberg D. 1995. Dementia associated with bilateral carotid occlusions: neuropsychological and haemodynamic course after extracranial to intracranial bypass surgery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58:633-636.
- Tatu L**, Vuillier F. 2014. Structure and vascularization of the human hippocampus. *Front Neurol Neurosci* 34:18-25.
- Tobin MK**, et al. 2019. Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. *Cell Stem Cell* 24:974-982 e973.
- Toni N**, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, van Praag H, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH. 2007. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10:727-734.
- Toyama K**, et al. 2015. ASK1 is involved in cognitive impairment caused by long-term high-fat diet feeding in mice. *Sci Rep* 5:10844.
- Treves A**, Rolls ET. 1992. Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus* 2:189-199.
- Troyner F**, Bicca MA, Bertoglio LJ. 2018. Nucleus reuniens of the thalamus controls fear memory intensity, specificity and long-term maintenance during consolidation. *Hippocampus* 28:602-616.
- Tsai TH**, Lin CJ, Chua S, Chung SY, Yang CH, Tong MS, Hang CL. 2017. Melatonin attenuated the brain damage and cognitive impairment partially through MT2 melatonin receptor in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Oncotarget* 8:74320-74330.
- Turner MR**, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB. 2004. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [¹¹C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15:601-609.
- van Praag H**, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- van Praag H**, Shubert T, Zhao C, Gage FH. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680-8685.
- Vaure C**, Liu Y. 2014. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol* 5:316.
- Veldhoen M**, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC, Stockinger B. 2008. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453:106-109.
- Venkat P**, Chopp M, Chen J. 2015. Models and mechanisms of vascular dementia. *Exp Neurol* 272:97-108.
- Verdu EF**, Bercik P, Verma-Gandhu M, Huang XX, Blennerhassett P, Jackson W, Mao Y, Wang L, Rochat F, Collins SM. 2006. Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut* 55:182-190.
- Vogel-Ciernia A**, Wood MA. 2014. Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci* 69:8 31 31-17.
- Walter S**, et al. 2007. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem* 20:947-956.
- Wan Q**, Ma X, Zhang ZJ, Sun T, Xia F, Zhao G, Wu YM. 2017. Ginsenoside Reduces Cognitive Impairment During Chronic Cerebral Hypoperfusion Through Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulated by Epigenetic Modulation. *Mol Neurobiol* 54:2889-2900.
- Wang J**, Zhang HY, Tang XC. 2010. Huperzine a improves chronic inflammation and cognitive decline in rats with cerebral hypoperfusion. *J Neurosci Res* 88:807-815.
- Wang L**, Larson EB, Bowen JD, van Belle G. 2006. Performance-based physical function and future dementia in older people. *Arch Intern Med* 166:1115-1120.
- Wang ML**, et al. 2018a. Central blockade of NLRP3 reduces blood pressure via regulating inflammation microenvironment and neurohormonal excitation in salt-induced prehypertensive rats. *J Neuroinflammation* 15:95.

- Wang ML**, et al. 2018b. Blockade of TLR4 Within the Paraventricular Nucleus Attenuates Blood Pressure by Regulating ROS and Inflammatory Cytokines in Prehypertensive Rats. *Am J Hypertens* 31:1013-1023.
- Weuve J**, Kang JH, Manson JE, Breteler MM, Ware JH, Grodstein F. 2004. Physical activity, including walking, and cognitive function in older women. *JAMA* 292:1454-1461.
- Whitney NP**, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. 2009. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 108:1343-1359.
- Wietrzych M**, Meziane H, Sutter A, Ghyselinck N, Chapman PF, Chambon P, Krezel W. 2005. Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. *Learn Mem* 12:318-326.
- Wilck N**, et al. 2017. Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature* 551:585-589.
- Wilkinson D**, Roman G, Salloway S, Hecker J, Boundy K, Kumar D, Posner H, Schindler R. 2010. The long-term efficacy and tolerability of donepezil in patients with vascular dementia. *Int J Geriatr Psychiatry* 25:305-313.
- Witter MP**, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T. 2000. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci* 911:1-24.
- Wolf SA**, Boddeke HW, Kettenmann H. 2017. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* 79:619-643.
- Wolff T**, Guirguis-Blake J, Miller T, Gillespie M, Harris R. 2007. Screening For Asymptomatic Carotid Artery Stenosis. Rockville (MD).
- Wu C**, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, Regev A, Kuchroo VK. 2013. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* 496:513-517.
- Yang I**, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT. 2010. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci* 17:6-10.
- Yao L**, Kan EM, Lu J, Hao A, Dheen ST, Kaur C, Ling EA. 2013. Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia. *J Neuroinflammation* 10:23.
- Yirmiya R**, Rimmerman N, Reshef R. 2015. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci* 38:637-658.
- Yoo KY**, Choi JH, Hwang IK, Lee CH, Lee SO, Han SM, Shin HC, Kang IJ, Won MH. 2010. (-)-Epigallocatechin-3-gallate increases cell proliferation and neuroblasts in the subgranular zone of the dentate gyrus in adult mice. *Phytother Res* 24:1065-1070.
- Yu A**, Duan H, Zhang T, Pan Y, Kou Z, Zhang X, Lu Y, Wang S, Yang Z. 2016. IL-17A promotes microglial activation and neuroinflammation in mouse models of intracerebral haemorrhage. *Mol Immunol* 73:151-157.
- Zainuddin MS**, Thuret S. 2012. Nutrition, adult hippocampal neurogenesis and mental health. *Br Med Bull* 103:89-114.
- Zha C**, Zhang W, Gao F, Xu J, Jia R, Cai J, Liu Y. 2018. Anti-beta2GPI/beta2GPI induces neutrophil extracellular traps formation to promote thrombogenesis via the TLR4/MyD88/MAPKs axis activation. *Neuropharmacology* 138:140-150.
- Zhang Y**, et al. 2019. Toll-Like Receptor 4 Promotes Th17 Lymphocyte Infiltration Via CCL25/CCR9 in Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol*.