



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Canvis vasculars associats a l'envelliment en models animals de demència vascular

Marina Purroy Rodríguez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB)
Universitat de Barcelona (UB)

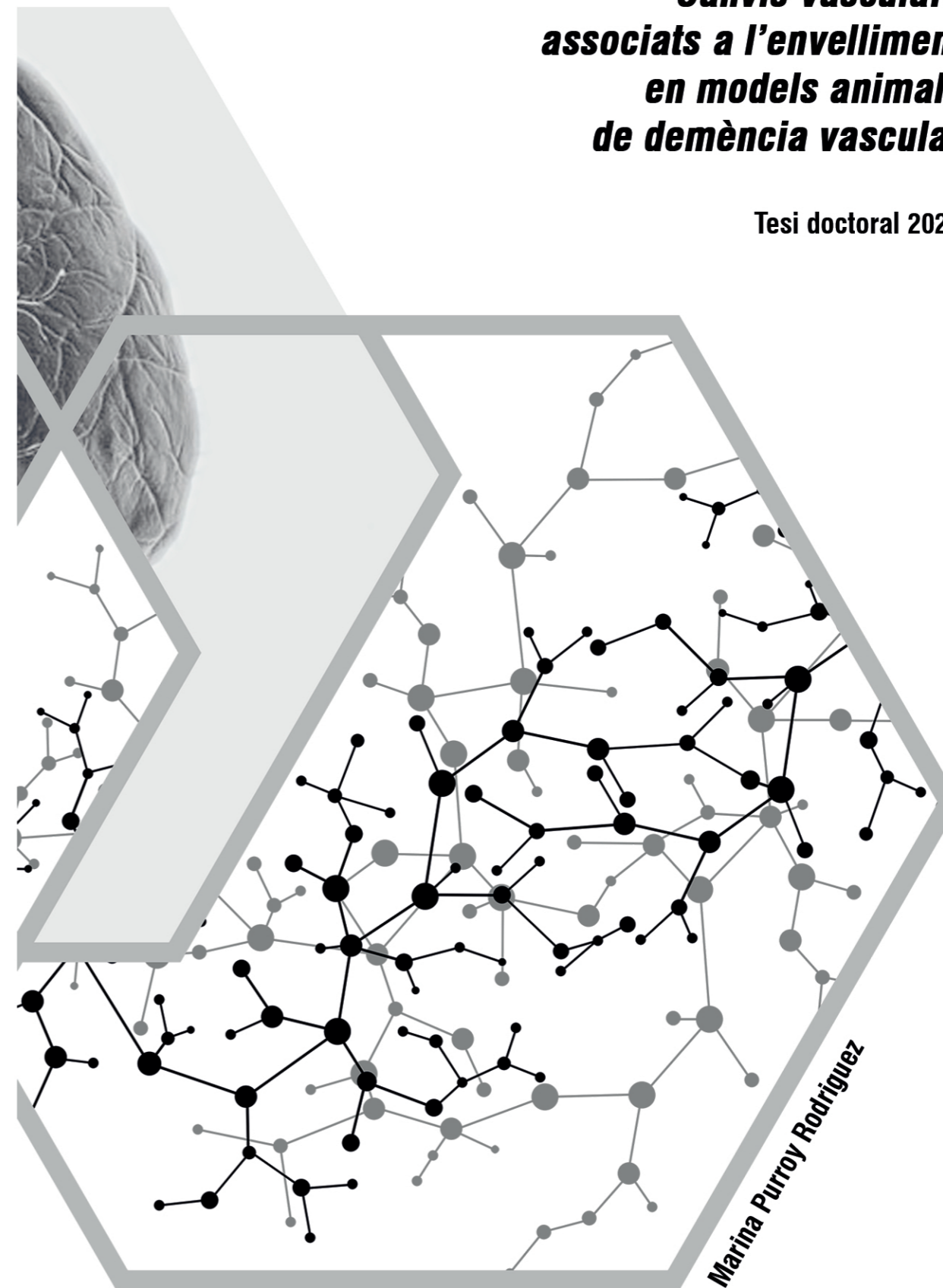


Canvis vasculars associats a l'envelliment en models animals de demència vascular

Tesi doctoral 2021 - Marina Purroy Rodriguez

***Canvis vasculars
associats a l'envelliment
en models animals
de demència vascular***

Tesi doctoral 2021



CANVIS VASCULARS ASSOCIATS A L'ENVELLIMENT EN MODELS ANIMALS DE DEMÈNCIA VASCULAR

Tesi doctoral

Programa de Doctorat en Biomedicina, Universitat de
Barcelona

Presentada per:

Marina Purroy Rodríguez

Barcelona, a 29 d'abril de 2021



CANVIS VASCULARS ASSOCIATS A L'ENVELLIMENT EN MODELS EN MODELS ANIMALS DE DEMÈNCIA VASCULAR

Aquest treball presentat per **Marina Purroy Rodríguez** s'ha realitzat al Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC) dins dels projectes nacionals del "Ministerio de Ciencia e Innovación" en culminació dels requeriments del programa de Doctorat en Biomedicina des dirigida per:

Dr. **Carles Justícia Mercader** del IIBB-CSIC, Universitat de Barcelona.

Barcelona, a 29 d'abril de 2021

Director:

Carles Justícia Mercader



Candidata:

Marina Purroy Rodríguez



Tutora:

Anna Maria Planas Obradors



Finançament

- Plan Nacional 2015 font de finançament “Ministerio de Ciencia e Innovación” amb codi DPI2015-64358-C2-2-R.
- Marina Purroy va rebre la beca FI 2018 de l'AGAUR de la Generalitat de Catalunya per a la contractació de personal d'investigació novell. Aquesta beca rep finançament del fons social europeu (FSE).

“Much that passes as idealism is disguised hatred or disguised love of power”

– Bertrand Russell –

**∞ A la meva àvia, per haver estat
sempre estadísticament significativa ∞**

AGRAÏMENTS

Si esteu llegint aquesta part de la tesi és perquè probablement hi hagueu contribuït d'alguna manera. Desconec la quantitat de cops que he rebut ajuda per part vostra i, es que en sou tants, que és complicat dedicar-vos les paraules que us mereixeu un per un. Així que només us diré que gràcies de debò a tots.

Podria escriure durant hores amb un somriure creixent sobre tots els membres del grup i els moments que hem compartit, però millor ho mantenim entre nosaltres com fins ara. Destacar el suport incondicional de Judit, que és capaç de llençar-se al buit amb mi sense qüestionar-s'ho. L'IIBB no és més que un institut de recerca i tots vosaltres amb el vostre cor immens, el feu un lloc genial. Carme i el seu somriure perenne, el seu bon rotllo que s'encomana; Tere que tants cops m'ha baixat a obrir la porta i m'ha acompanyat a primera hora del matí; les paraules d'ànims i l'alegria constant de Pedro i el duo dinàmic Rafa/Edu; en els moments "tesi drama" no podria haver estat millor acompanyada per l'Elisa i la meva estimada Cris i rebre les paraules d'alè i ànims de gent transparent com la Susana, l'Esther o l'Amaia. Em poso a escriure i no puc parar de riure, recordant coses bones amb vosaltres. Encara que no hem compartit tants moments com hauria volgut, cadascun d'ells ha estat inesborrable (dinars de cantina, birres, cases rurals, xerrades transcendents, etc). Espero que aviat puguem celebrar-ho a Albelda.

Tot això, mai hagués sigut possible sense l'empenta de la Marta, mai ha dubtat de mi i sempre m'ha encoratjat a seguir, per exemple, a demanar la FI. Gràcies per aparèixer al màster i no desaparèixer mai més.

Per molts, el doctorat és un pas complicat, però un pas més. Per mi ha estat un gran repte on he pogut superar cadascuna de les meves pors. Encara recordo allò de que "fer el doctorat és molt complicat" mentre em preguntava com podria tornar a la Universitat. O la por que passava per poder pujar al ferrocarril i no perdre la meitat de mi en l'intent. Jo, que he patit un ictus, puc dir que no és difícil però que, malauradament, tot el sistema ho complica fins a punts tant extrems que has de lluitar contra massa frustració, injustícia i, finalment, no s'arriba on s'ha d'arribar, és a dir, a la gent que realment ho necessita. Per tot plegat, vull agrair i dedicar aquestes paraules a les persones que veritablement han estat al peu del canó des del 2011 fins ara. No sé

en quin moment vaig passar de sobreviure a viure, ni quan vaig deixar de veure només cicatrius al meu cos per sentir-lo. Però sé que va ser quan la vida us va posar a cadascun de vosaltres en el meu camí. Gràcies a Adriana per ser el volant i l'accelerador de la meua cadira de rodes manual. Gràcies a Vero per ser la única infermera capaç de dir-me "anem a fer-te un TAC perquè alguna cosa no va bé" i aconseguir que no tingui por. Gràcies a David per recolzar-me sempre, fins i tot quan estudiava en mi mateixa la dosi apropiada de *Keppra*. Gràcies a tots per mantenir-vos fermes mentre jo penjava del fil de la cordura i la coherència.

Les meves més grans gràcies als meus pares. Em sorprèn cada any pel dia del pare o de la mare que tothom tingui els millors pares del món perquè em fa gràcia com d'equivocats estan ja que els millors pares els tinc jo indubtablement. Estic molt orgullosa del que m'heu transmès: a ser constant, a ser pragmàtica, a estimar sense límits el que faig, a donar-ho tot en tot moment i a prendre decisions des de la tranquil·litat del no haver de dependre d'un sistema absurdament corrupte i obsolet. Sobretot, moltes gràcies per ser-hi en els pitjors moments, des de les llargues estàncies a l'hospital fins a les llargues hores d'anàlisi: "no veus que has pintat un píxel que no hi tocava?".

Són molt poques les persones que han sabut ser-hi de debò dins i fora de l'hospital però tu, Maria n'ets el millor exemple. Vint-i-nou anys juntes són massa coses per resumir aquí quan, en realitat, ja saps quant d'agraïda t'estic i, ara que començaré a viure, et faré la botifarra tants cops com faci falta per recordar-nos com de vives estem. Ets, juntament amb Sara, el nom per definir què és una amiga a la vida. Gràcies a les dues per acceptar les meves rareses amb tanta naturalitat.

Diego, tu has estat l'últim en aparèixer però el que més d'a prop ha navegat en el meu mar de gel quan les coses no anaven com a mi m'hauria agradat. Gràcies per aparèixer per sorpresa i ser un pilar mestre silenciós a la meua vida. Gràcies també per presentar-me als meus millors amics del Vallés: Toni, Martin i Esther, la meua companya literària. Sé que un dia, junts, recollirem el que amb tant d'esforç estem sembrant.

No podria acabar aquests agraïments sense incloure a "Las chicas de narrativa", que tanta vida i alegries m'han aportat aquest any. Em van coaccionar molt hàbilment a

participar en un curs de narrativa i agafar les regnes del meu llibre. Amb les correccions de la tesi, em deien que era massa poètica, cosa que em frustrava molt però, ara de forma molt orgullosa, puc dir que Sí sóc poètica escrivint. Petar-se de riure està assegurat al costat d'Imma, Memen, Esther i Roci.

Vaig començar la tesi al poc de morir una de les meves grans amigues, Carol. Abril de 2015, començava a fer bo i, de cop, astrocitoma de grau IV a la protuberància. Volia tancar-me a casa i plorar però no em van deixar. En part suposo que vaig poder tirar endavant pensant en com ella desitjava les nostres vides fins poc abans de morir. Poc després d'iniciar el meu contracte, es va morir la meva àvia, qui em va criar i em va estimar sense límits. *"Ai gagueta, que has de fer en rates? Ja podries ser mestra. Iaia són ratoliiiins!!!"*. Són les persones que més em faltaran el dia de la defensa de la tesi però, sé que estarien orgullosos d'acompanyar-me a tancar aquesta última etapa universitària. La meva àvia estic segura que riuria amb els tecnicismes, no escoltaria res però em miraria amb aquells ulls blaus irresistibles als que ningú podria negar el *cum laude*. Carol ja estaria esperant-me ansiosa per la festa de després a la que jo no voldria assistir però, m'acabaria arrossegant de les orelles.

Diu el Grom que mereix sortir als agraïments per tots els cops que ha trepitjat el teclat amb les seves potetes brutes i m'ha esborrat un paràgraf que acabava d'escriure amb molt d'esforç. Amb aquesta bava enganxifosa que em cau a sobre, no li puc dir no.

Al 2007 Jack em va anomenar afectuosament "little flower". Ahir em va dir que "little flower has blossomed" i és tan bonic que ell també mereix les gràcies per confiar en que jo floriria algun dia.

Ara, sento que porto tota la vida sent un peix molt petit que s'emporta la corrent i necessito aturar-me a pensar quin serà el meu proper objectiu, ens veiem a la mar!

ÍNDEX

PRINCIPALS ABREVIATURES.....	5
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓ.....	13
1. DEMÈNCIA I EL SEU IMPACTE SOCIO-SANITARI	15
2. HISTÒRIA DE LA DEMÈNCIA.....	16
3. VASCULATURA CEREBRAL.....	18
3.1. UNITAT NEUROVASCULAR	20
3.2. ENDOTELI.....	22
3.3. PERÍCITS.....	23
3.4. CÈL·LULES GLIALS	24
3.5. MICROVASCULATURA, ENVELLIMENT I DEMÈNCIA.....	25
4. CAUSES DE DEMÈNCIA	30
5. DEMÈNCIA VASCULAR (DV)	32
5.1. TIPUS DE LESIONS QUE PODEN CAUSAR DV	35
5.2. MALATIA DE PETIT VAS	37
5.3. MALALTIA DE GRAN VAS	39
6. FACTORS DE RISC DE DEMÈNCIA.....	42
6.1. ENVELLIMENT.....	42
6.2. ATROSCLEROSI.....	46
6.3. HIPERTENSIÓ	49
7. TRACTAMENT DE LA DEMÈNCIA	52
8. EINES DIAGNÒSTIQUES EN DEMÈNCIA	55
9. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL.....	65
HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	67
MATERIALS I MÈTODES	71

1.	DISSENY EXPERIMENTAL	73
2.	MODEL ANIMAL.....	74
2.1.	RATOLINS KNOCK-OUT PER L'APOLIPOPROTEÏNA E	74
2.2.	HIPOPERFUSIÓ CRÒNICA PER ACAS	75
3.	CONDUCTA	77
3.1.	ROTAROD	77
3.2.	TEST GRIP	78
3.3.	TEST DE CAMP OBERT (OF)	79
3.4.	TEST DE RECONeixEMENT DE NOUS OBJECTES (NORT)	79
4.	IMATGE PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA (MRI).....	80
4.1.	IMATGE D'ANGIOGRAFIA TIME-OF-FLIGHT (TOF).....	83
4.2.	IMATGE DE PERFUSIÓ ARTERIAL SPIN LABELING (ASL).....	84
4.3.	MAPES T2 I MAPES T2*	85
4.4.	IMATGE PER TENSORS DE DIFUSIÓ (DTI)	88
5.	ESTUDI HISTOPATOLÒGIC.....	91
5.1.	PROCESSAMENT DEL TEIXIT	91
5.2.	CLARIFICACIÓ PER 3DISCO	92
5.3.	IMMUNOHISTOQUÍMICA	94
6.	ESTADÍSTICA	95
	RESULTATS.....	97
1.	ENVELLIMENT EN RATOLINS C57BL6.....	99
1.1.	ALTERACIONS VASCULARS	99
1.1.1.	Alteracions en la macrovasculatura	99
1.1.2.	Alteracions en la microvasculatura	101
1.2.	ALTERACIONS DE LA SUBSTÀNCIA BLANCA	103
1.2.1.	Alteracions a les fibres de mielina <i>in vivo</i>	104
1.2.2.	Alteracions a les fibres de mielina <i>ex vivo</i>	107
1.3.	ALTERACIONS A LA SUBSTÀNCIA GRISA.....	110

1.4.	ALTERACIONS EN LA CONDUCTA	111
2.	ENVELLIMENT EN RATOLINS APOE ^{-/-} I COMPARATIVA AMB ELS C57BL6.....	114
2.1.	ALTERACIONS VASCULARS	114
2.1.1.	Alteracions en la macrovasculatura	114
2.1.2.	Alteracions en la microvasculatura	120
2.2.	ALTERACIONS A LA SUBSTÀNCIA BLANCA	125
2.2.1.	Alteracions a les fibres de mielina <i>in vivo</i>	125
2.2.2.	Estudi d'alteracions a les fibres de mielina <i>ex vivo</i>	128
2.3.	ALTERACIONS A LA SUBSTÀNCIA GRISA.....	132
2.4.	ALTERACIONS EN LA CONDUCTA	135
3.	HIPOPERFUSIÓ.....	140
3.1.	ALTERACIONS VASCULARS	140
3.1.1.	Alteracions en la macrovasculatura	140
3.1.2.	Alteracions en la microvasculatura	147
3.2.	ALTERACIONS A LA SUBSTÀNCIA BLANCA	152
3.2.1.	Alteracions en les fibres de mielina detectables per imatges de DTI.....	152
3.2.2.	Alteracions en les fibres de mielina a nivell histopatològic.....	162
3.3.	ALTERACIONS A LA SUBSTÀNCIA GRISA.....	164
3.4.	ALTERACIONS CONDUCTUALS	166
3.4.1.	Coordinació motora	166
3.4.2.	Força muscular.....	168
3.4.3.	Capacitat exploratòria.....	169
3.4.4.	Capacitat de reconeixement	173
	DISCUSSIÓ.....	175
1.	NECESSITAT DE NOUS BIOMARCADORS EN DV.....	177
2.	ENVELLIMENT I ATEROSCLEROSI	180
3.	HIPOPERFUSIÓ.....	191
4.	FUTURES DIRECCIONS	202
	CONCLUSIONS	205
	BIBLIOGRAFÍA	209

PRINCIPALS
ABREVIATURES

- **AB:** artèria basilar
- **AD:** difusió axial
- **AD:** malaltia d'Alzheimer
- **ACAS:** model d'estenosi bilateral asimètrica de les artèries caròtides comunes
- **ACIe:** artèria caròtida interna esquerra
- **ACId:** artèria caròtida interna dreta
- **ApoE:** apolipoproteïna E
- **ApoE^{-/-}:** ratolins knockout per l'apolipoproteïna E
- **Angiografia TOF:** angiografia TOF (de l'anglès Time-Of-Flight)
- **BHE:** barrera hematoencefàlica
- **CBF:** flux sanguini cerebral
- **CT:** gruix cortical
- **DCL:** demència per cossos de Lewy
- **DFT:** demència frontotemporal
- **DTI:** imatge per tensors de difusió
- **DV:** demència vascular
- **FA:** anisotropia fraccionada
- **GFAP:** proteïna àcida fibril·lar glial
- **Iba-1:** molècula adaptadora d'unió al calci ionitzat
- **MBP:** proteïna bàsica de la mielina
- **MD:** difusió mitjana
- **MRI:** imatge per ressonància
- **NORT:** test de reconeixement de nous objectes
- **NVU:** unitat neurovascular
- **OF:** test del camp obert
- **Perfusió ASL:** perfusió ASL (de l'anglès Arterial Spin Labelling)
- **SVD:** malaltia de petit vas (small-vessel disease)
- **RD:** difusió ortogonal
- **VCI:** deteriorament cognitiu de tipus vascular

ABSTRACT

Introducció: El deteriorament cognitiu d'origen vascular, i més concretament la demència vascular (DV), s'associa al compromís persistent del flux sanguini cerebral i representa la segona causa més freqüent de demència al món, després de la malaltia d'Alzheimer. La DV és una malaltia caracteritzada per múltiples i discretes lesions isquèmiques, lesions difuses a la substància blanca (leucoaraiosi) i hemorràgies cerebrals, entre d'altres. S'han dedicat gran quantitat d'esforços en la recerca dels mecanismes fisiopatològics subjacents a aquesta patologia però encara no es coneixen amb precisió. Les tècniques de neuroimatge, com la imatge per ressonància (MRI), van suposar un gran avenç en el diagnòstic d'aquesta patologia. Per aquest motiu, en aquest treball de tesi doctoral s'ha proposat l'estudi longitudinal de canvis estructurals i funcionals vasculars al llarg del temps en animals d'experimentació, en el curs dels símptomes de la malaltia, i sota la influència de diversos factors de risc, mitjançant diferents tècniques de MRI per trobar nous biomarcadors no invasius per la DV, i per avançar en l'estudi de la seva fisiopatologia, així com en el diagnòstic precoç i la monitorització de l'efectivitat de noves teràpies.

Material i mètodes: Es van utilitzar un total de 174 ratolins de dues soques, ratolins ApoE^{-/-}, que tenen predisposició a desenvolupar aterosclerosi amb l'edat, i els ratolins control C57Bl6 de tres edats diferents, des de l'adult jove (6 mesos) fins a la vellesa (18 mesos) incloent una edat intermitja (12 mesos). Es va realitzar un seguiment longitudinal amb tècniques de MRI per estudiar diferents característiques de les lesions vasculars, que es van correlacionar proves de comportament. La validació de les tècniques de MRI es va realitzar mitjançant tincions d'immunohistoquímica per MBP i la clarificació de talls gruixuts de cervell (2 mm) per quantificació de la microvasculatura.

Resultats: Es van detectar alteracions relacionades amb aterosclerosi i hipoperfusió en longitud i tortuositat de les principals artèries que irriguen el cervell mitjançant angiografia TOF. També en relació a la irrigació del cervell, es van trobar canvis en el flux sanguini cerebral mitjançant perfusió ASL, associats a les tres condicions estudiades (envelliment, aterosclerosi i hipoperfusió). Així mateix, les tres condicions experimentals van provocar alteracions en les fibres de mielina, detectades amb l'anàlisi dels diferents components dels tensors de difusió (DTI). Aquests canvis es van trobar a estructures relacionades amb les alteracions en les proves de conducta, com ara en ansietat,

memòria de reconeixement, debilitat muscular i pertorbacions en la marxa. D'altra banda, l'índex Q va mostrar menys sensibilitat que l'anàlisi histopatològic per a l'estudi de la densitat microvascular. Tot i això, va servir per detectar canvis en la densitat microvascular associats a l'edat. Els canvis en el gruix de l'escorça cerebral (atròfia cortical) mesurats per MRI va resultar ser un bon biomarcador de la mort neuronal produïda per l'envelliment i la hipoperfusió.

Conclusions: Els resultats d'aquest estudi confirmen la utilitat de la MRI com a eina per avaluar els canvis estructurals i funcionals de la neuropatologia de l'envelliment, l'aterosclerosi i la hipoperfusió en recerca traslacional.

INTRODUCCIÓ

1. DEMÈNCIA I EL SEU IMPACTE SOCIO-SANITARI

La demència és una síndrome de manifestació clínica heterogènia produïda per diferents lesions cerebrals o malalties neurodegeneratives que alteren la composició bioquímica del cervell posant en compromís les funcions cerebrals i l'autonomia del pacient (Elahi FM and Miller BL, 2017). Les alteracions cel·lulars i moleculars condueixen a la mort neuronal, donant lloc a una reducció en el nombre de sinapsis i disrupció de les xarxes neurals. La demència és una malaltia que normalment afecta persones d'edat avançada (>65 anys). La demència vascular és la segona causa de demència (Figura 1), i sovint pot presentar-se conjuntament amb la malaltia d'Alzheimer (Dening T and Sanddilyan MB, 2015).

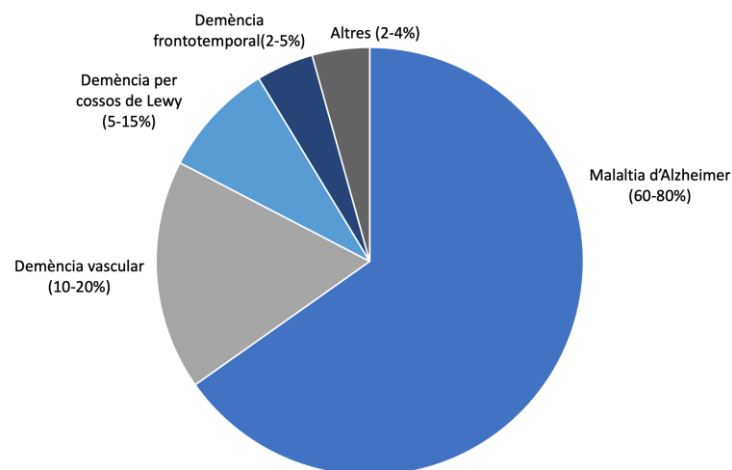


Figura 1. Percentatge dels diferents tipus de demència. Dades obtingudes de Dening T and Sanddilyan MB, 2015.

La demència és una de les principals causes de discapacitat severa a llarg termini a nivell mundial, reduint la qualitat de vida dels pacients i les seves famílies. Entre el 2010 i el 2019, va representar la setena causa de mort a nivell mundial (WHO, 2019). Moltes de les malalties que influeixen sobre el risc de patir demència es troben també entre les principals causes de mort, com l'infart de miocardi i l'ictus. Al 2010, es va estimar que 35.6 milions de persones al món patien demència. Es preveu que aquesta xifra es dupliqui cada 20 anys, sent 65.7 milions al 2030 i 115.4 al 2050 (WHO, 2012). A nivell mundial hi ha 7.7 milions de casos nous de demència a l'any, cosa que implica que apareix un cas nou cada 4 segons. Per tot plegat, la recerca en el camp de demència és una prioritat.

2. HISTÒRIA DE LA DEMÈNCIA

Demència és un terme que ve de la paraula llatina *demens*, que significa trobar-se fora d'un mateix. Tot i que aquest terme es va encunyar al segle XIII, ja en l'època dels egipcis i els romans es van iniciar les seves primeres descripcions (Assal F., 2019). Fins el segle XVIII no es van poder realitzar els primers estudis anatòmics en relació a la demència, principalment per restriccions religioses. Les persones amb demència eren internades en psiquiàtrics perquè no va ser fins finals del segle XIX que es va començar a entendre les bases patològiques de la malaltia. Els grans avenços en el camp de la demència van arribar al segle XX, quan els estudis d'histologia van permetre identificar lesions característiques dels diferents tipus de demències. A partir dels anys 60, amb el desenvolupament de tècniques bioquímiques, es va poder determinar la composició bioquímica de les lesions en demència. Actualment, s'espera que combinant biomarcadors per tècniques de neuroimatge, tests neurològics de cribratge i proves bioquímiques s'entendran millor els processos biològics que condueixen a demència i es podrà trobar tractaments efectius per la malaltia.

En definitiva, s'ha passat d'un concepte fenomenològic amb conseqüències legals a entendre-la com una malaltia heterogènia amb múltiples alteracions moleculars (Fig. 2).

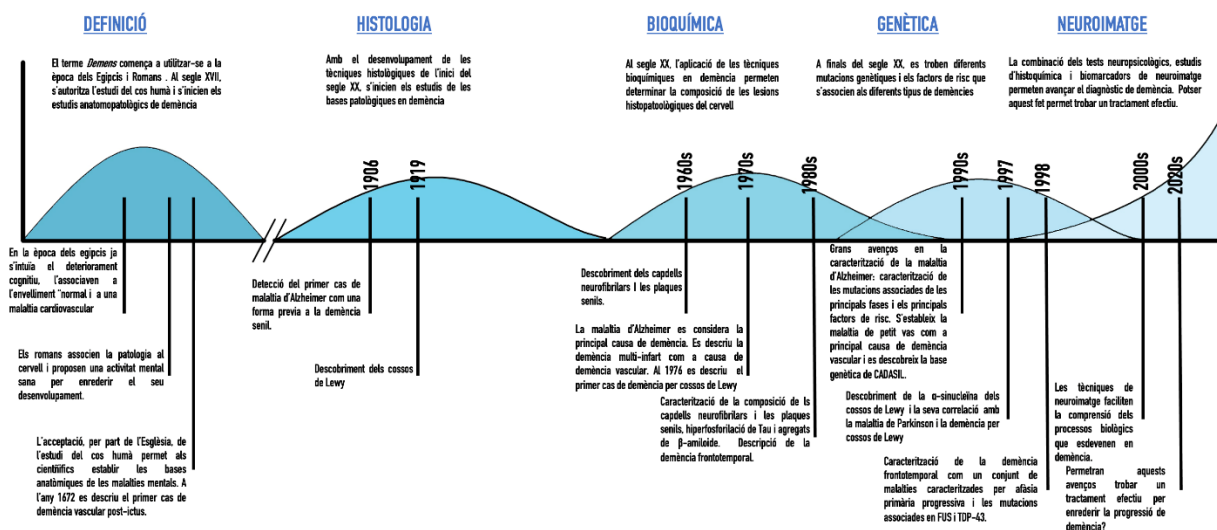


Figura 2. Evolució històrica de la demència. Elaboració pròpia.

La caracterització de la demència vascular té els seus orígens en Hipòcrates (460-370 a.C), que va insinuar que els accidents cerebrovasculars podien associar-se a demència (Balcells M, 2009). Abans del segle XX, es considerava que la principal causa de demència era la rigidesa arterial produïda per la pèrdua d'elasticitat associada a

l'edat (Figura 3). Amb els avenços tecnològics, es van anar afegint altres possibles causes, des de la presència de múltiples infarts fins a la rarefacció de la substància blanca o leucoaraiosi (Iadecola C, 2013). Es pensa que l'origen de la demència vascular és multifactorial, donat que són molts els factors que influeixen sobre la circulació cerebral. El terme de deteriorament cognitiu de tipus vascular (VCI) es va adoptar per descriure el conjunt de dèficits cognitius causats per factors vasculars. A partir dels anys 90, es van descriure alteracions genètiques, com mutacions en el gen *Notch 3*, associades a la malaltia CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy), que es caracteritza per ser una demència que s'origina cap als 30 anys amb múltiples accidents cerebrovasculars que evolucionen a un quadre de labilitat emocional i demència.

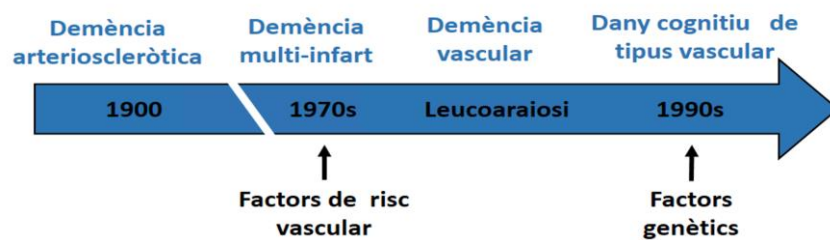


Figura 3. Evolució del concepte de deteriorament cognitiu a deteriorament cognitiu de base vascular. Extret de Iadecola C, 2013.

3. VASCULATURA CEREBRAL

El cervell representa un 2% de la massa corporal però requereix del 20% de la despesa cardíaca per mantenir la seva homeòstasi, ja que té una baixa capacitat d'emmagatzemar nutrients (Nagata K et al., 2016). Com a mecanisme de prevenció front a canvis bruscs en la irrigació cerebral, el cervell té la capacitat de mantenir constant el flux sanguini mitjançant un mecanisme d'autoregulació, que depèn de la vasculatura.

El subministrament sanguini del cervell procedeix de dos sistemes vasculars, el sistema carotídi o sistema anterior, que aporta el 80% de la sang que arriba al cervell, i el sistema vertebral o sistema posterior, que aporta el 20% restant de la sang que arriba al cervell. Ambdós sistemes d'irrigació s'originen a l'aorta, a nivell del tronc braquio-encefàlic. D'aquesta regió surten les dues artèries caròtides comunes i les dues artèries vertebrales. Mentre que les artèries caròtides comunes es bifurquen donant lloc a les artèries caròtides externa (ACE) i interna (ACI), les artèries vertebrales es fusionen per donar lloc a l'artèria basilar (AB). Les artèries caròtides internes i basilar, s'endinsen a la base del cervell on es forma un circuit entre els dos sistemes anomenat polígon de Willis. Del polígon de Willis surten les principals artèries cerebrals: artèria cerebral anterior (ACA), artèria cerebral mitja (ACM) i artèria cerebral posterior (ACP). L'artèria cerebral anterior i l'artèria cerebral mitja irriguen la part anterior i mitja dels hemisferis, part dels ganglis basals i la càpsula interna. L'artèria cerebral posterior irriga part dels ganglis de la base, el tronc encefàlic i el cerebel. Des del polígon de Willis es distribueix de forma homogènia el flux sanguini cerebral per compensar possibles alteracions de perfusió originades a qualsevol branca dels diferents sistemes d'irrigació cerebral. Aquests vasos principals donen lloc a les artèries pials, una xarxa vascular rica en anastomosis a la superfície cerebral. Les artèries pials penetren a l'interior del parènquima cerebral donant lloc a les arterioles.

La regulació del flux sanguini es dona a dos grans nivells, per una banda, les artèries pials, que es troben fora del parènquima cerebral, regulen canvis en la pressió arterial i, per una altra banda, la microvasculatura que coordina la resposta d'hiperèmia davant d'una major demanda energètica (Bagher P i Segal SS, 2011). En la regulació del flux sanguini, la microvasculatura s'ha de coordinar amb les artèries pials. En definitiva, la regulació del flux sanguini depèn de la integritat i la coordinació dels diferents

components de la paret arterial (Figura 4), que varien al llarg del tronc arterial. En condicions no patològiques, la paret arterial està composta per tres capes cel·lulars.

- **Capa externa o capa adventícia:** composta per col·lagen, proteoglicans i la vasa-vasorum. Tots aquests components estan separats de la següent capa per la làmina elàstica externa.
- **Capa mitja o túnica mitja:** constituïda principalment per cèl·lules musculars llises i fibres de col·lagen. Està separada de la següent capa per la làmina elàstica interna.
- **Capa interna o túnica íntima:** formada per una monocapa de cèl·lules endotelials unides entre sí per unions estretes (endoteli).

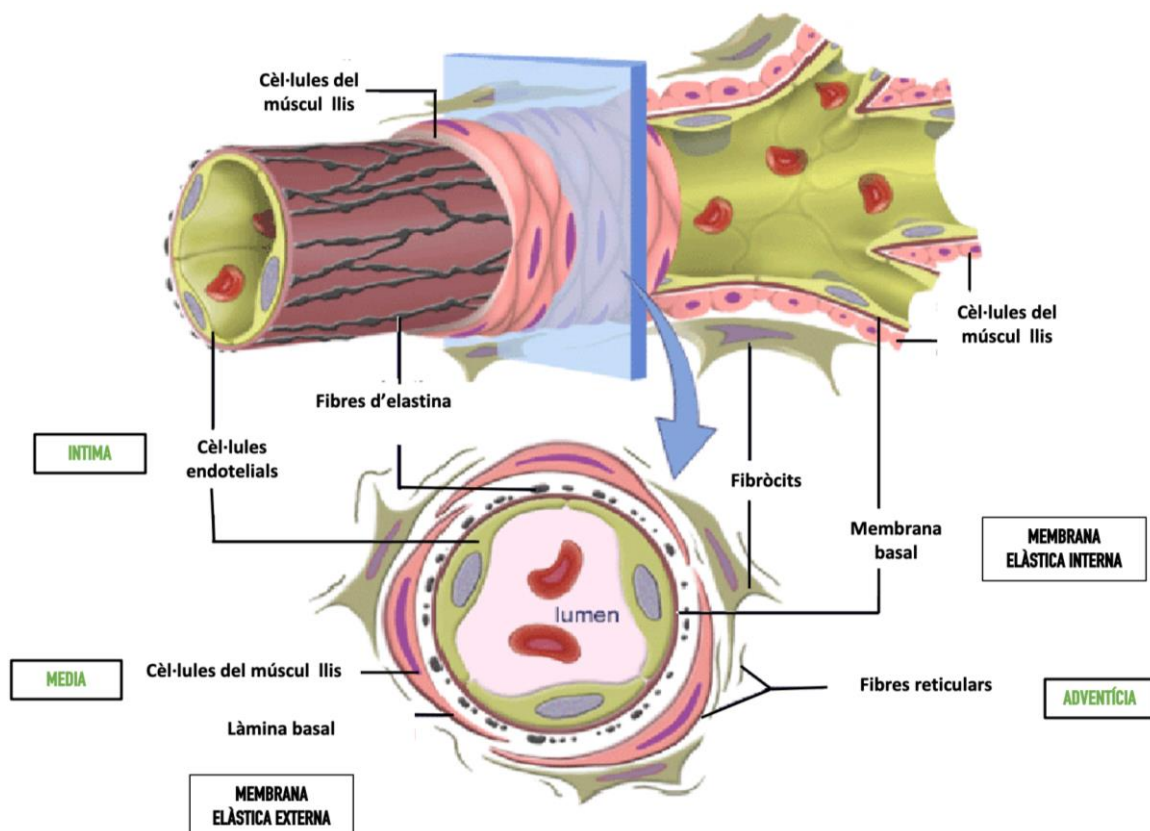


Figura 4. Estructura de la paret vascular al cervell. Modificat a partir de la tesi de Goyal P, 2005; tesi doctoral no publicada).

3.1. UNITAT NEUROVASCULAR

La unitat neurovascular (NVU) és un terme que s'utilitza per descriure la relació entre les cèl·lules cerebrals i els vasos sanguinis. Les funcions principals de la NVU són regular el transport de substàncies al parènquima cerebral i regular el flux sanguini cerebral. Per poder dur a terme aquestes funcions correctament, es necessita la integració dels seus diferents components. La NVU està constituïda per neurones, astròcits, cèl·lules endotelials, cèl·lules murals (cèl·lules musculars llises i perícits), i components de la matriu extracel·lular (Muoio V et al., 2014).

La barrera hemato-encefàlica (BHE) és una barrera altament restrictiva que contribueix a mantenir la homeòstasi del cervell. També serveix per regular el flux sanguini i el volum i la composició del líquid cefaloraquidi (LCR). La barrera hemato-encefàlica és una part essencial de la NVU, composta per cèl·lules endotelials, envoltades de la làmina basal i els peus dels astròcits, perícits i micròglia (Abbott NJ et al., 2006), tal i com s'observa a la Figura 5. Les cèl·lules endotelials es troben unides entre sí mitjançant unions estretes de forma que s'impedeix el pas de substàncies lliurement. L'existència d'aquestes unions fa que el transport hagi de ser majoritàriament transcel·lular, exceptuant gasos, com l'oxigen o el diòxid de carboni i petits agents lipofílics, com l'etanol o els barbitúrics, que poden difondre lliurement. Tot i això, la BHE és un sistema dinàmic, ja que la seva permeabilitat i el transport a través d'aquesta es pot modular. La resta de productes, ja siguin molècules hidrofíliques o molècules d'una mida gran, requereixen de sistemes de transport específics localitzats a la membrana de l'endoteli, com ara el GLUT-1, el principal transportador de glucosa al cervell.

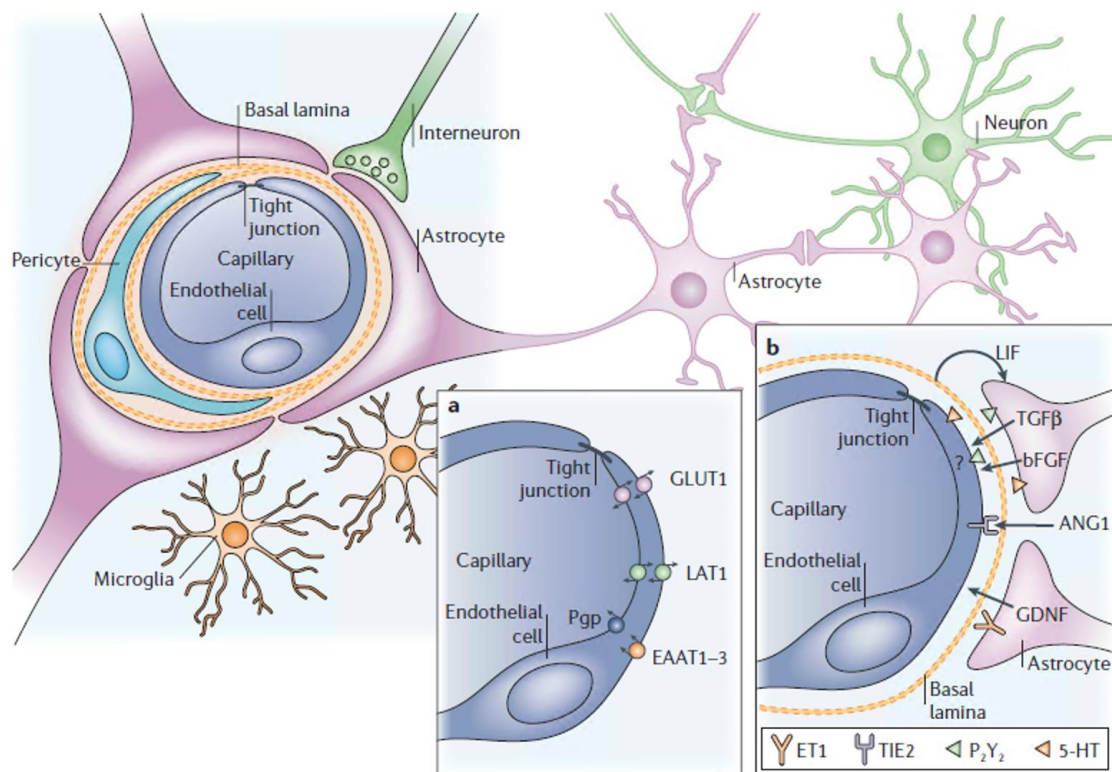


Figura 5. Components de la BHE. Extret de Abbot et al., 2006.

La composició de la paret arterial varia al llarg de l'arbre vascular (Kisler K et al 2017). A la part interna de les artèries penetrants es troba una monocapa de cèl·lules endotelials i la membrana basal, i més externament, de 1 a 3 capes de cèl·lules de musculatura llisa i la piamare (Figura 6). Mentre que la monocapa de cèl·lules endotelials es manté al llarg de l'arbre arterial, establint una barrera sostinguda a partir de les unions estretes, els grans canvis es produeixen en la túnica mitja. Les arterioles tenen una monocapa de cèl·lules musculars llises. Aquesta capa està recoberta pels peus terminals dels astròcits. En canvi, als capil·lars, les cèl·lules endotelials estan envoltades de perícits i alhora pels peus dels astròcits. Les cèl·lules de la NVU, a través de la seva íntima relació anatòmica i bioquímica (Drake CT i Iadecola C, 2007), regulen la resposta hemodinàmica.

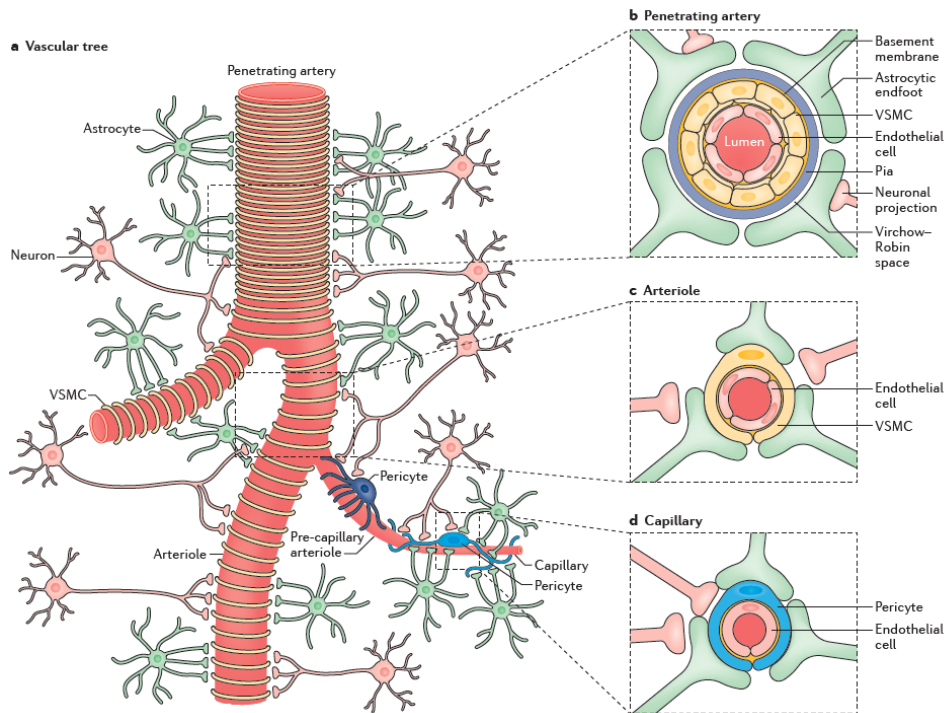


Figura 6. Representació esquemàtica de la composició cel·lular de la unitat neurovascular (NVU) al llarg de l'arbre vascular. Extret de Kisler K et al 2017.

Existeixen nombrosos mecanismes vasoreguladors que permeten controlar el flux sanguini requerit per suplir la demanda energètica del cervell. L'increment de l'activitat cerebral provoca una resposta hemodinàmica, que depèn, entre d'altres factors, de la senyalització entre les cèl·lules de la NVU, mediada per agents vasodilatadors com l'òxid nítric (NO), metabòlits de l'àcid araquidònic, neurotransmissors i neuropèptid, entre d'altres (Drake CT i Iadecola C, 2007).

3.2.ENDOTELI

L'endoteli recobreix internament l'arbre vascular, constituint una monocapa cel·lular no fenestrada, sostinguda mitjançant unions estretes. Les cèl·lules endotelials són plàstiques, molt sensibles a canvis patològics. Participen en nombrosos processos homeostàtics com l'eliminació de productes tòxics com el β -amiloide, i formen part de la barrera hematoencefàlica (Figura 7), regulant el pas de substàncies, molècules, cèl·lules, nutrients i gasos al parènquima i interaccionen amb altres cèl·lules de la unitat neurovascular per regular el flux sanguini cerebral (CBF).

L'endoteli és essencial en l'autoregulació de la resposta hemodinàmica cerebral (Faraci FM et al., 2004), regula el tràfic de cèl·lules i nutrients, manté la fluïdesa de la

sang, regula el to vasomotor, contribueix a regular la producció de mediadors pro-inflamatoris i anti-inflamatoris i participa en la generació de vasos nous (Gonzalez MA i Selwyn AP, 2003).

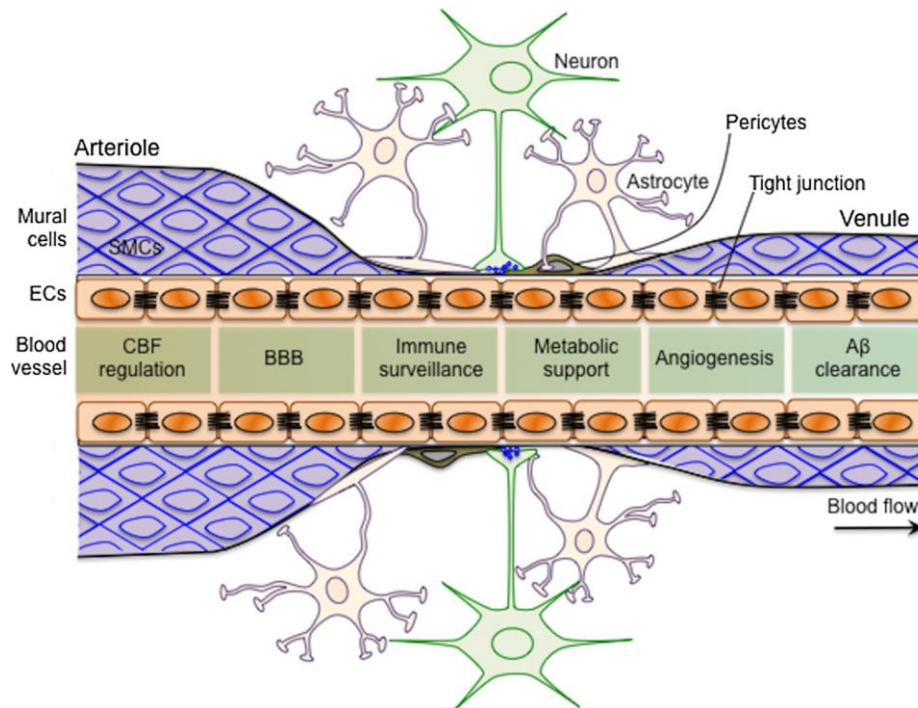


Figura 7. Funcions de l'endoteli al cervell. Extret de Faraci FM et al., 2004.

Donada la rellevància de la funció endotelial al cervell, s'ha associat la seva disfunció a dany cerebral i, com a conseqüència, a demència (Zlokovic BV, 2008). La disfunció endotelial és una de les alteracions que es donen en les fases més inicials de l'alteració de la funció cerebral (Park L et al., 2013). A la malaltia d'Alzheimer, les plaques d'amiloide alteren la funció neurovascular de manera que es produeix una reducció de la perfusió cerebral, donant lloc a dany isquèmic cerebral (Zlokovic BV, 2008). Una possible causa de les hiperintensitats a la substància blanca, característiques de la demència vascular, és la hipoperfusió provocada pel dany endotelial (Ter Telgte A et al., 2018).

3.3.PERÍCITS

Els perícits són cèl·lules mural·s que envolten les cèl·lules endotelials a nivell de vasos de petit calibre. Els perícits tenen capacitat contràctil de manera que regulen el diàmetre dels capil·lars (Iadecola C, 2004), participen en la formació i en el manteniment de la BHE i regulació del sistema neurovascular (estabilitat vascular, formació de vasos

nous i regulació del CBF). L'ablació dels perícits en ratolins per modificacions genètiques provoca trencament de la BHE (Nikolakopoulou AM et al., 2019). Els perícits participen en l'acoblament neurovascular que permet incrementar el flux sanguini cerebral davant de canvis en l'activitat neuronal (Peppiatt CM et al., 2006). La disfunció dels perícits contribueix a una gran varietat de malalties que donen lloc a deteriorament cognitiu com la malaltia d'Alzheimer o la demència vascular. En la malaltia d'Alzheimer, la reducció del nombre de perícits produeix alteracions microvasculars associades a alteracions en l'eliminació del β -amiloide. Les alteracions vasculars produïdes per la degeneració dels perícits en demència vascular s'associa a desmielinització (Montagne A et al., 2018).

3.4.CÈL·LULES GLIALS

La regulació de flux sanguini cerebral durant l'activitat cerebral depèn de la interacció coordinada entre neurones, cèl·lules vasculars i cèl·lules glials. La glia es classifica, segons el seu origen embriològic, en macròglia (astròcits i oligodendròcits) i micròglia. Les cèl·lules glials són essencials per la supervivència i homeòstasi neuronal i participen en la funció cerebral (Bolaños JP 2016; Fernandez-Fernandez S et al., 2012; Kubik LL i Philbert MA, 2015).

Les projeccions dels oligodendròcits formen la beina de mielina que actua com aïllant de l'axó front a substàncies tòxiques i li dona suport tròfic a la neurona. El cervell funciona com una xarxa on la comunicació es realitza mitjançant la propagació de l'impuls nerviós. Si es perd la comunicació cerebral, s'afecten les funcions cognitives. La beina de mielina permet conservar l'impuls nerviós. Els precursors dels oligodendròcits participen en la renovació i el manteniment de la mielina (Harris JJ i Attwell D, 2012). La seva capacitat de regeneració es veu compromesa amb l'envelliment, incrementant el risc d'interrupció de la propagació de l'impuls nerviós. Les lesions a la substància blanca subjacents a molts tipus de demències, independentment del seu origen, explicarien les alteracions cognitives en demència.

Els astròcits són cèl·lules petites que es troben recobrint la part externa del vasos de manera que participen en la regulació del flux sanguini, la transmissió sinàptica i la reparació tissular, entre d'altres (Gordon GR et al., 2007; Halassa MM et al., 2007;

Sofroniew MV, 2009). La disfunció dels astròcits s'associa a hipoperfusió cerebral i deteriorament cognitiu (Johnson NA et al., 2005; Ruitenberg A et al., 2005).

La micròglia són els macròfags residents al sistema nerviós central (SNC). Es troben amplament distribuïdes pel SNC de forma homogènia i s'activen davant estímuls estressants que poden ser nocius pel teixit. Són cèl·lules amb funció immunomoduladora i immunoreguladora i, per tant, un dels principals elements d'activació de la resposta neuroinflamatòria. Per aquesta raó, es creu que la micròglia pot contribuir a neurodegeneració i a la pèrdua de memòria en l'envelliment (Hanisch UK, 2013).

Tots els components de la NVU són importants i l'alteració de qualsevol d'aquests trenca l'equilibri cerebrovascular donant lloc a patologies com la demència, que és l'objecte d'estudi d'aquest treball.

3.5.MICROVASCULATURA, ENVELLIMENT I DEMÈNCIA

La microvasculatura és un sistema de vasos de petit calibre que inclou arterioles, capil·lars i vènules i que s'encarrega de subministrar els diferents components essencials (nutrients i oxigen) procedents del flux sanguini al parènquima cerebral. L'intercanvi de gasos i de nutrients es produeix fonamentalment a nivell capil·lar. Aquest procés és possible gràcies als canvis en la composició i l'estructura de la paret dels petits vasos de forma que es produeix un contacte més íntim entre circulació i les cèl·lules del parènquima estretament regulat per la BHE.

La circulació cerebral no només permet mantenir un flux sanguini cerebral constant, sinó que permet incrementar el flux sanguini davant una major demanda energètica. Aquest mecanisme s'anomena hiperèmia funcional i depèn de la integritat i la coordinació de les cèl·lules de la NVU, tal i com es mostra a la Figura 8.

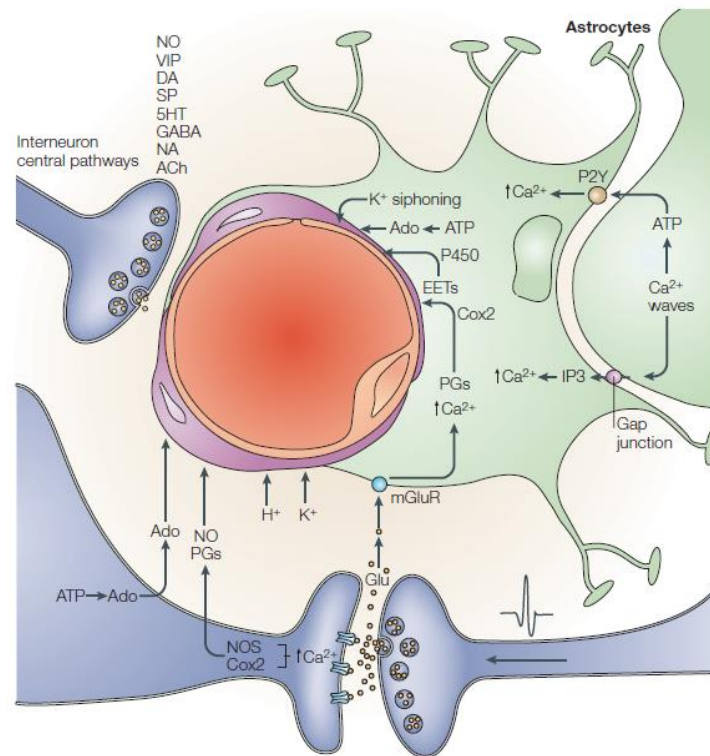


Figura 8. Mediadors vasoactius alliberats per neurones i cèl·lules gials que regulen la resposta hemodinàmica. Extret de Iadecola C, 2004.

Les cèl·lules de la NVU garanteixen el subministrament de gasos i nutrients i el manteniment de la homeòstasi del microambient de les cèl·lules cerebrals. Qualsevol alteració en la senyalització de les cèl·lules de la NVU, produeix una desregulació dels mecanismes de control cerebrovascular. Les alteracions en aquests mecanismes de control s'associen a trastorns neurodegeneratius com l'envelliment, la hipoperfusió o la demència (Iadecola C, 2004).

L'envelliment produeix desacoblament de la NVU per l'alteració de diferents mecanismes cel·lulars (inflamació, senescència, estres oxidatiu i deficiència de IGF-1, entre d'altres). Els mecanismes a través dels quals l'envelliment produeix desacoblament neurovascular són multifactorials, com s'observa a la Figura 9.

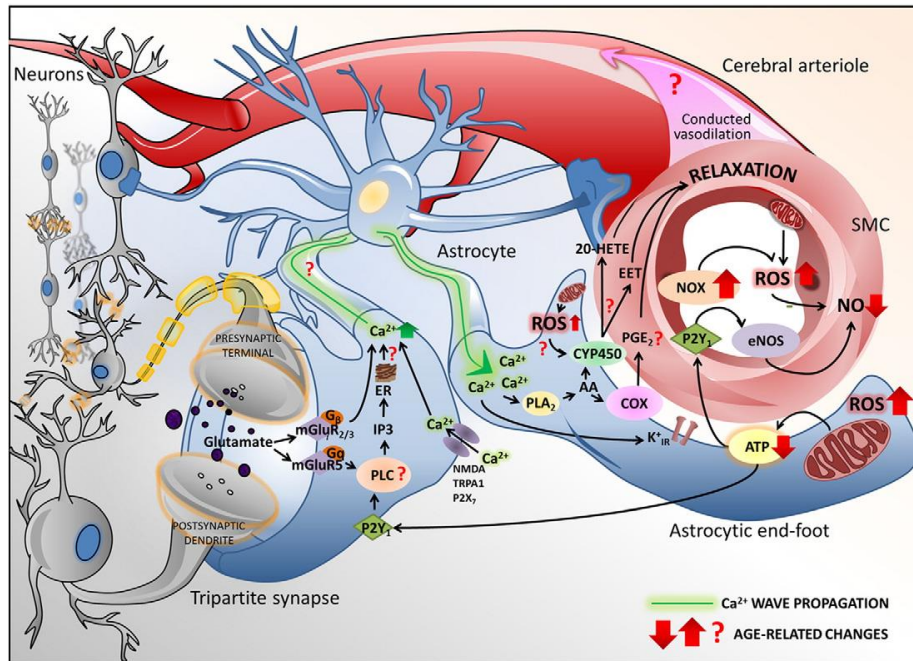


Figura 9. Mecanismes cel·lulars associats a l'envelliment que produeixen desacoblament neurovascular. Extret de Tarantini S et al., 2017.

La major part de les alteracions cerebrovasculares que es donen amb l'envelliment s'explicarien amb la disfunció de l'endoteli microvascular i la disfunció astrocitària. En condicions normals, l'alliberament de glutamat produeix onades de Ca^{2+} en els astròcits de forma que permeten la producció d'ATP. L'ATP té com a objectiu estimular la producció de factors vasodilatadors com el NO, les prostaglandines o els àcids epoxieicosatrienoics en les cèl·lules endotelials. Durant l'envelliment s'altera aquest mecanisme, afectant a la producció de substàncies vasodilatadores (Chen BR et al., 2014; Zonta M et al., 2003). L'envelliment cel·lular es caracteritza per produir estrès oxidatiu que causaria la disfunció endotelial de la microvasculatura (Park L et al., 2007; Toth P et al., 2014). Les alteracions en l'acoblament neurovascular promouen el deteriorament cognitiu en persones d'edat avançada.

La hipoperfusió cerebral és una condició d'insuficiència circulatòria causada per un trastorn del control circulatori o manca de líquid circulant. Com que el cervell no té la capacitat d'emmagatzemar energia, la hipoperfusió pot produir danys neurològics devastadors. La susceptibilitat de les diferents regions cerebrals a la hipoperfusió és variable. La substància blanca és especialment vulnerable als canvis. La menor densitat cel·lular – principalment oligodendròcits, beines de mielina i altres cèl·lules glials – fa

que tingui una menor despesa energètica, i com a conseqüència rep una tercera part del subministrament sanguini respecte la resta del cervell (Harris JJ i Attwell AD, 2012).

La reducció del flux sanguini cerebral provoca hipòxia, que explicaria la formació d'infarts isquèmics i alteracions en la substància blanca (Figura 10). També produeix una reducció del metabolisme de la glucosa, donant lloc a una reducció de la funció mitocondrial. Les alteracions vasculars produïdes per la reducció del CBF són disfunció endotelial, estrès oxidatiu, remodelació vascular, increment de la pressió arterial, reducció de reactivitat cerebrovascular i augment de la tortuositat vascular, entre d'altres. En conjunt, tots aquests fenòmens poden desencadenar neuroinflamació, alteracions en la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica i mort cel·lular que donen lloc a la neurodegeneració que condueix a demència (Raz L et al., 2016).

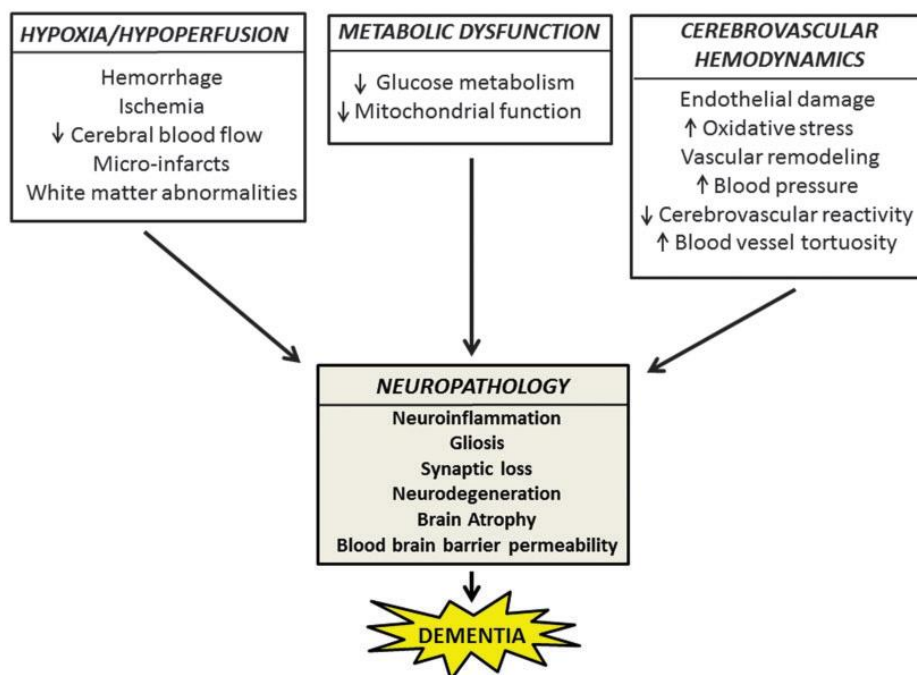


Figura 10. Neuropatologia vascular de la de demència. Extret de Raz L et al., 2016.

Les alteracions cerebrovasculars són freqüents en persones d'edat avançada amb demència (Villeneuve S et al., 2014). Darrera d'aquestes alteracions cerebrovasculars hi ha la disfunció de l'acoblament neurovascular, que causaria deteriorament cognitiu de tipus vascular subjacent en molts tipus de demències. Les conseqüències de la disfunció neurovascular són la hipoperfusió, alteracions en el metabolisme cerebral i alteracions hemodinàmiques. L'alteració de les funcions cognitives és conseqüència del dany neuronal produït per alteracions vasculars i

hipoperfusió cerebral (Honjo K et al., 2012). El desacoblament neurovascular afecta la resposta hemodinàmica i la BHE, que seria una de les possibles causes de la malaltia de petit vas (Figura 11). Les alteracions hemodinàmiques contribueixen a la reducció del subministrament de substàncies essencials front un increment de la demanda energètica. Les alteracions de la BHE afecten la funció astrocitària que, al seu torn, dificulta l'intercanvi de fluids i bloqueja la maduració dels precursors de oligodendròcits, que impedeix la formació i la reparació de la mielina.

L'alteració de la funció astrocitària provoca mort neuronal, donat que els astròcits donen suport tròfic a les neurones. Al seu torn, la mort neuronal produeix la pèrdua de mielina. En conjunt, tots aquests esdeveniments es donen en les alteracions vasculars de la malaltia de petit vas, que es creu que és la principal causa de demència vascular.

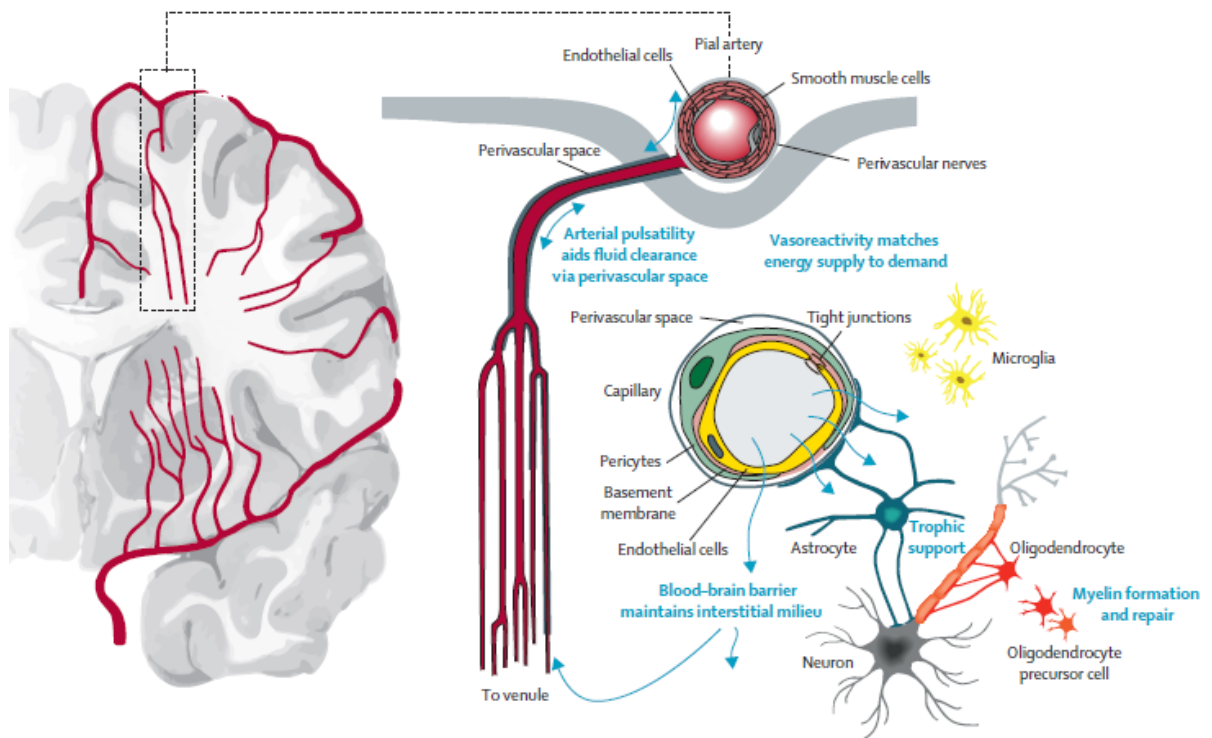


Figura 11. Constituents de la NVU i possibles mecanismes patològics de la malaltia de petit vas. Extret de Wardlaw JM, et al., 2013.

4. CAUSES DE DEMÈNCIA

Existeixen diferents causes de demència que, tot i ser entitats diferents, són difícils de distingir. Les classificacions que existeixen són múltiples, però bàsicament existeixen dos grans grups de causes de demència, les proteïnopaties neurodegeneratives i les d'origen vascular. Totes elles tenen en comú que apareixen en edats avançades. L'edat és un dels factors de risc de demència més important i probablement explicaria per què sovint es manifesten simultàniament, dificultant així el seu diagnòstic.

Tot i que aquest treball de tesi doctoral es centra en les demències d'origen vascular, cal fer un breu esment de les proteïnopaties neurodegeneratives més importants, entre les que trobem la malaltia d'Alzheimer, la demència per cossos de Lewy, i la demència frontotemporal. La malaltia d'Alzheimer (AD) és la principal causa de demència al món. És una proteïnopatia dual caracteritzada per la formació de plaques senils i cabdells neurofibril·lars (Figura 12). Les plaques senils són agregats insolubles de proteïna A β que es troben a l'espai extracel·lular i a la paret dels vasos. Els cabdells neurofibril·lars són agregats intracel·lulars de proteïna Tau hiperfosforilada. La AD s'inicia amb una pèrdua de la memòria d'esdeveniments recents i alteracions en la fluència semàntica perquè aquests agregats inicialment es formen als lòbuls temporals. Progressivament les lesions es van estenent de manera que els símptomes cada cop són més evidents i apareixen símptomes neuropsiquiàtrics que acaben afectant a l'autonomia del pacient. La forma esporàdica d'AD (>95% dels casos) es donen en persones d'entre 80 i 90 anys. En canvi, la forma familiar constitueix una petita proporció que s'inicia abans dels 45 anys (<1%). Tot i anomenar-se forma esporàdica també s'han trobat alteracions genètiques associades, com l'expressió de l'al·lel ϵ 4 de l'apolipoproteïna E, també relacionat amb les demències d'origen vascular. Sovint les plaques amiloides es troben molt a prop de vasos sanguinis, afectant la microcirculació cerebral.

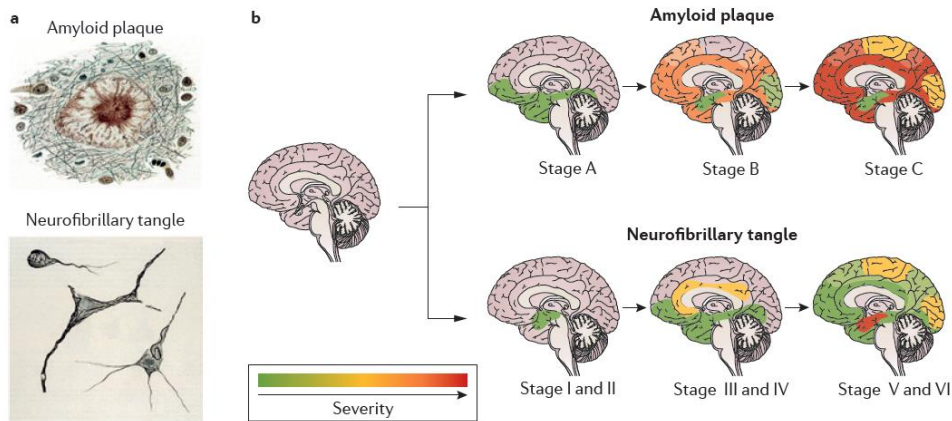


Figura 12. Evolució patològica de la malaltia d'Alzheimer. **A)** Plaques senils i cabdells neurofibril·lars. **B)** Progressió de la malaltia en les diferents regions cerebrals. Extret de Masters et al 2015.

La demència per cossos de Lewy (DCL) representa el 10-15% dels casos de demència esporàdica. És una proteïnopatia caracteritzada per la formació d'inclusions d' α -sinucleïna. Els símptomes primerencs són el dèficit d'atenció, pèrdua de la funció executiva, al·lucinacions i desordres de la son en fase REM. En fases més avançades, apareixen alteracions en la memòria i símptomes motors parkinsonians i autonòmics (Arnaoutoglou NA et al., 2019).

La demència frontotemporal (DFT) és un conjunt heterogeni de patologies neurodegeneratives caracteritzades per un declivi prominent de les conductes socials i el comportament com desinhibició, apatia, hiperoralitat i una disfunció prominent del llenguatge anomenada afàsia primària progressiva (PPA). Acostuma a manifestar-se en edats joves. Aquest grup de malalties es caracteritzen per la degeneració tant de les estructures corticals com de les subcorticals dels lòbuls temporal i frontal.

5. DEMÈNCIA VASCULAR (DV)

El terme deteriorament cognitiu vascular (VCI) fa referència a qualsevol grau de deteriorament cognitiu causat per patologia vascular, des del deteriorament cognitiu lleu fins a la demència vascular (DV). A diferència de la resta de causes de demència, el VCI no és una proteïnopatia.

El dany cerebral vascular acostuma a ser difús perquè no afecta a una regió cerebral específica, a diferència de les demències neurodegeneratives per proteïnopatia (Van Der Flier WM et al., 2018). Per aquest motiu, el terme DV inclou un ampli espectre de manifestacions clíniques heterogènies. No totes les estructures cerebrals són igual de sensibles a la lesió vascular, per això les manifestacions són heterogènies. Una de les regions cerebrals particularment sensibles al dany vascular és la substància blanca frontal, relacionada amb múltiples funcions cognitives.

La DV comparteix algunes característiques amb la malaltia d'Alzheimer (Gorelick PB et al., 2011; Wu YT et al., 2016; Zaccai J et al., 2006). Les principals eines que permeten el diagnòstic diferencial entre aquestes són les tècniques de neuroimatge, que permeten estudiar les lesions vasculares i quantificar el dany a la substància blanca.

Segons l'Associació Americana de malalties cardiovasculars (AHA) i l'Associació Americana d'ictus (ASA) i en relació als criteris diagnòstics del DSM-V, el diagnòstic de DV requereix de la combinació de tests neuropsicològics i de l'estudi de les lesions vasculares mitjançant diferents modalitats d'imatge per ressonància magnètica (MRI). S'apliquen diferents tests neuropsicològics com el mini-test d'examinació de l'estat mental (Folstein MF et al., 1975), el test d'assessorament cognitiu de Montreal (Nasreddine ZS et al., 2005) o l'entrevista telefònica per l'avaluació de l'estat cognitiu (Barber M i Stott DJ et al., 2004). Mentre que el mini-test d'examinació de l'estat mental es va dissenyar per l'avaluació de pacients amb AD, la resta inclouen eines d'avaluació de la funció executiva. El diagnòstic de demència vascular inclou el deteriorament cognitiu d'almenys dos dominis cognitius (funció executiva, atenció, memòria, llenguatge i funcions viso-espacials) que siguin suficientment limitants en l'execució de les tasques del dia a dia i la detecció per MRI de l'extensió, la localització i el tipus de lesions vasculares.

Durant molts anys es va atribuir la demència vascular a l'esclerosi de les artèries cerebrals, que causa dany isquèmic difús i atròfia cerebral (Jellinger KA, 2006). Actualment, no es coneix exactament la causa de DV però s'atribueix a l'alteració dels vasos sanguinis cerebrals (Iadecola C, 2013). Les alteracions vasculars que causen deteriorament cognitiu són múltiples, des de les alteracions sistèmiques que afecten a la perfusió cerebral global, fins a alteracions estratègiques o locals que afecten específicament vasos sanguinis cerebrals, especialment arterioles i vènules. Les principals lesions cerebrals que es donen com a conseqüència en DV són: múltiples i discretes lesions isquèmiques, lesions difuses a la substància blanca (leucoaraiosis) i hemorràgies cerebrals, entre d'altres (Figura 13).

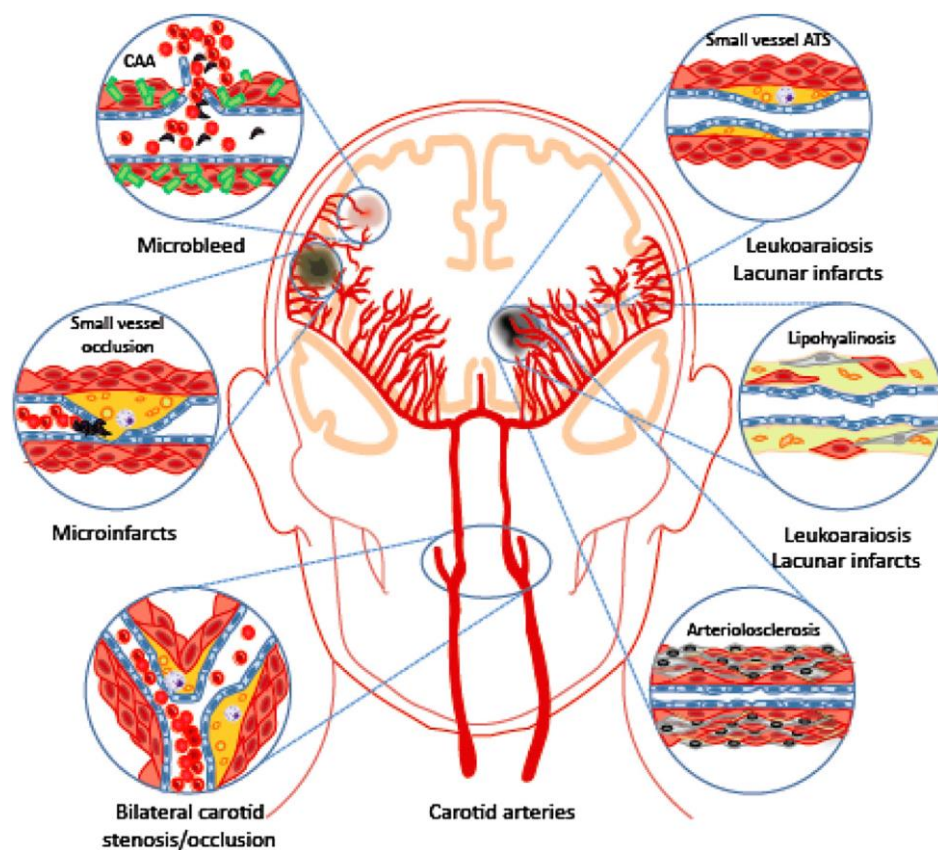


Figura 13. Lesions vasculars que s'associen a deteriorament cognitiu vascular. Obtinguda de Iadecola C, 2013.

El nombre d'anastomosis disminueix a mesura que l'arbre arterial s'endinsa al parènquima, de manera que les artèries terminals deixen de tenir connexions entre elles. Això comporta que la oclusió dels petits vasos sigui difícil de compensar, donant lloc a una reducció del flux sanguini cerebral (CBF) o hipoperfusió, que explicaria la formació de microinfarts cortico-subcorticals.

La hipoperfusió cerebral s'associa a inflamació i estrès oxidatiu (Dong YF et al., 2011; Juma WM et al., 2011). L'estrès oxidatiu induït per factors de risc vascular provoca disfunció endotelial, alteracions en la auto-regulació cerebrovascular, disfunció de l'acoblament neurovascular, dèficits de NO, reducció del CBF conduït a hipoperfusió i hipòxia tissular (Figura 14). A més, hi ha un increment de la permeabilitat de la BHE com a conseqüència de la disfunció endotelial que comporta l'extravasació de proteïnes plasmàtiques al teixit, com ara l'albumina o el fibrinogen, entre d'altres. El fibrinogen activa receptors TLR i CD11b, provocant un increment de la producció de ROS, de citocines pro-inflamatòries i metaloproteïnases (MMP) de la micròglia activada, els astròcits i les cèl·lules OPC (Davalos D i Akassoglou K, 2012). La inflamació, al seu torn, agreuja el trencament de la BHE i indueix l'expressió de molècules d'adhesió a l'endoteli, contribuint a l'adhesió leucocitària i plaquetària i a la oclusió microvascular (Iadecola C i Anrather J, 2011).

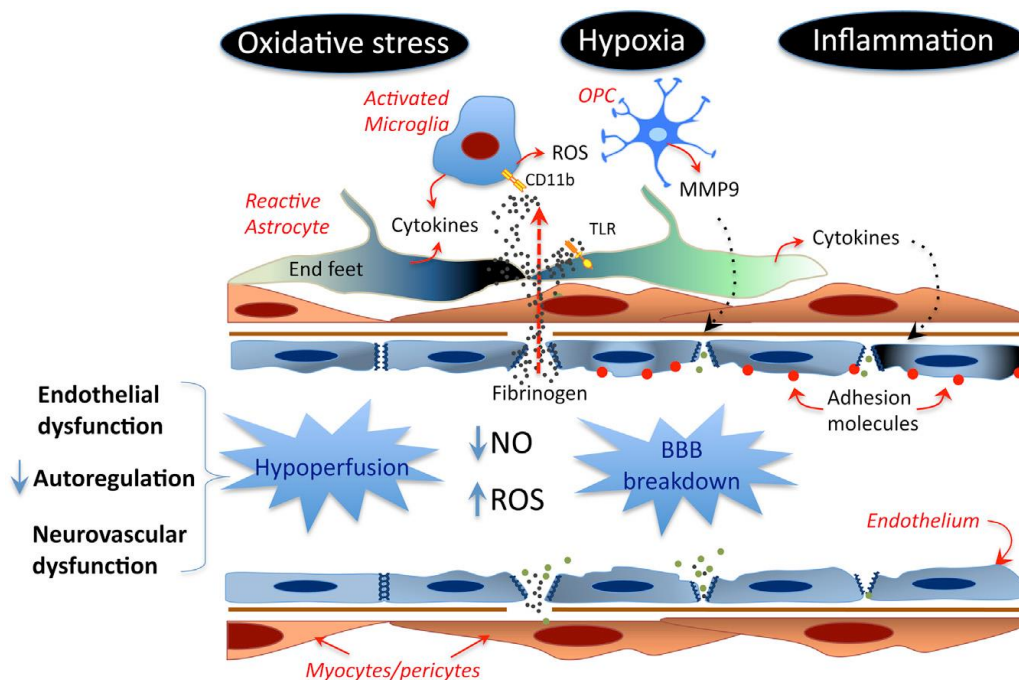


Figura 14. Mecanismes de dany vascular induïts per factors de risc vascular. Extret de Iadecola C, 2013.

Es coneixen molts factors que expliquen per què s'altera la funció cerebral davant de les alteracions vasculars, donant lloc a deteriorament cognitiu i demència, però no es coneixen completament les causes concretes de la malaltia, fent més difícil el tractament preventiu o pal·liatiu dels efectes del deteriorament cognitiu de tipus vascular. A diferència de les proteïnopaties neurodegeneratives que donen lloc a demència, no hi ha una diana proteica contra la que es poden produir fàrmacs i, per aquest motiu, en demència vascular, el més efectiu és el control dels factors de risc vascular com ara la hipertensió amb fàrmacs anti-hipertensius.

5.1. TIPUS DE LESIONS QUE PODEN CAUSAR DV

La DV es caracteritza per un deteriorament cognitiu que apareix com a conseqüència d'un dany vascular subclínic o d'haver patit un ictus. S'han definit fins a 6 subtipus de lesions vasculars (Kalaria RN et al. 2004) que poden causar DV (Figura 15):

- I. Demència vascular associada grans infarts o múltiples infarts
- II. Demència vascular associada a múltiples infarts petits
- III. Demència vascular associada a infarts estratègics
- IV. Demència vascular associada a hipoperfusió cerebral
- V. Demència vascular associada a hemorràgies cerebrals
- VI. Demència vascular associada a la malaltia d'Alzheimer (demència mixta)

	TYPE I	TYPE II	TYPE III	TYPE IV	TYPE V	TYPE VI
BRAIN INJURY	Large infarcts or cortical infarcts	Multiple small infarcts or lacunes	Strategic infarcts/lacunae	Hypoperfusive lesions, HS	Cerebral haemorrhages	CVD pathology with AD
CAUSES	LVD; atherosclerosis	SVD; microvascular changes	Embolic/hypertensive disease	Cardiac arrest; MI	Different angiopathies	Stroke injury and aging-related AD
CLINICS	Focal signs, stepwise progression	No or slight focal signs, insidious progression	Focal signs, stepwise progression	Absence of focal signs, insidious progression	Focal signs, stepwise progression	Absence of focal signs, insidious progression
CONSEQUENCES	MID or cortical VaD	SIVD	Strategic infarct dementia	VCI or VaD	VCI or dementia with CH	VaD with AD pathology

Figura 15. Classificació dels diferents tipus de demència vascular. Modificat a partir de Kalaria RN, 2016.

Les principals alteracions vasculars que donen lloc a deteriorament cognitiu vascular són hipoperfusió cerebral, malaltia de gran vas, angiopatia amiloide cerebral (CAA) i la malaltia de petit vas (Dichgans M i Leys D, 2017), tal i com s'observa a la Figura 16. Les dues causes més comunes de DV són la malaltia de petit vas i els accidents cerebrovasculars. D'entre totes aquestes causes possibles destaca la malaltia de petit vas, associada a alteracions de la BHE que afecten a la homeòstasi del teixit cerebral, vessament de líquid i macromolècules al teixit, i dany crònic a la substància blanca. La malaltia de petit vas pot causar microinfarts cortico-subcorticals, ictus lacunars, hipoperfusió, atrofia hipocampal i esclerosi, que són característiques de la DV.

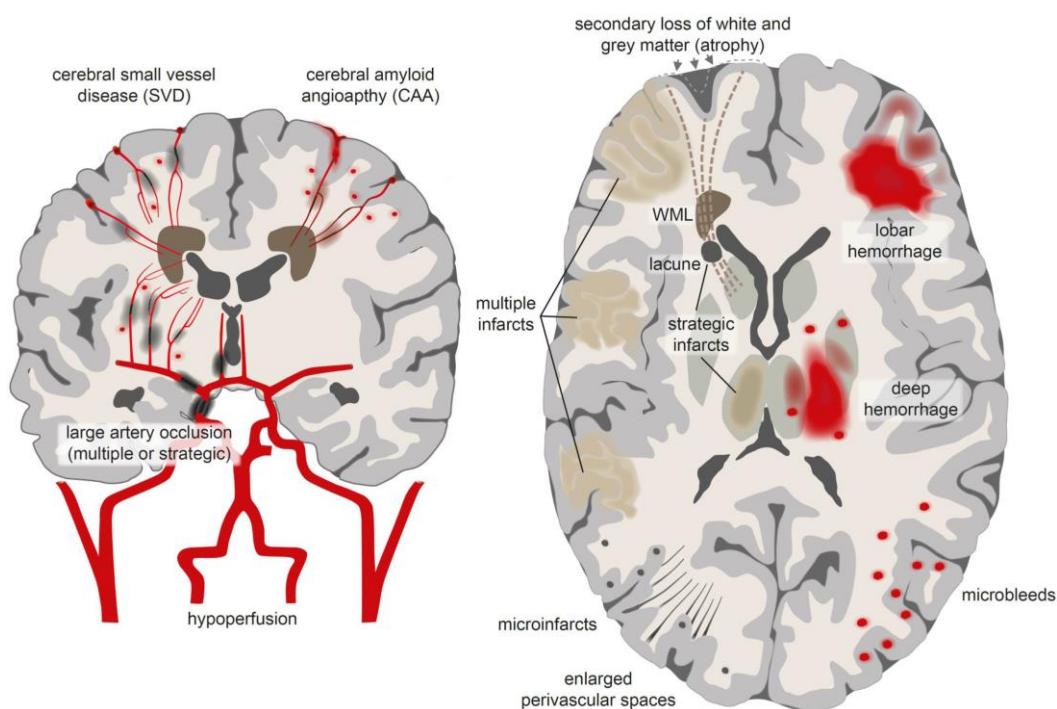


Figura 16. Principals mecanismes patològics subjacents als deteriorament cognitiu vascular. Extret de Dichgans M i Leys D, 2017.

S'ha descrit que el 48% dels casos de DV presenten malaltia de petit vas, el segon subtipus més freqüent es deguda a la malaltia de gran vas (33%). El 14 % s'atribueix a lesions estratègiques al cervell i el 5% restant s'associa a causes indeterminades (Kalara RN, 2018). A continuació es detallaran les lesions vasculars de la malaltia de petit vas i la malaltia de gran vas, ja que són les causes més freqüents de DV.

5.2.MALATIA DE PETIT VAS

Una quarta part dels casos dels ictus isquèmics es causada per la malaltia de petit vas, així com també és causa comú d'ictus hemorràgics, pot produir deteriorament cognitiu i és la principal causa de demència vascular (Bos D et al., 2018; Kapasi A et al., 2017; Metacohorts Consortium, 2016). Aquesta malaltia afecta els vasos cerebrals de petit calibre, incloent les artèries perforants, les arterioles, les vènules i els capil·lars (Pantoni L, 2010).

La malaltia de petit vas (SVD) es caracteritza per produir lesions vasculars com hiperintensitats de la substància blanca, infarts lacunars, engruiximent dels espais perivasculars, microhemorràgies, infarts subcorticals i atròfia cerebral (Wardlaw JM et al., 2013).

La SVD és una malaltia vascular que progressivament altera la connectivitat cerebral de les xarxes fronto-subcorticals donant lloc a símptomes frontals (Cummings JL, 1993) com, per exemple, alentiment de la velocitat de processament mental i alteracions en les funcions executives de manera que es veuen afectades les funcions cognitives, motores i de la conducta.

El desenvolupament de les tècniques de neuroimatge ha permès avançar en el diagnòstic d'aquesta malaltia però, com és una vasculopatia heterogènia, les lesions que s'observen per MRI no són més que la punta de l'iceberg (Auriel E et al., 2014). Tal i com s'observa a la Figura 17 es coneixen 6 tipus diferents de SVD, segons l'origen de la lesió vascular (Pantoni L, 2010):

1. **SVD causada per factors de risc vascular (especialment, hipertensió) i associada a l'envelliment:** afecta principalment a les arterioles perforants. Es caracteritza per l'engruiximent de la paret vascular pel dipòsit de col·lagen i proteïnes plasmàtiques, pèrdua de cèl·lules de la musculatura llisa i extravasació de proteïnes plasmàtiques. A l'inici es presenta com arteriosclerosi i finalment es mostra com lipohialinosi, fibrosi i necrosi.
2. **SVD per angiopatia amiloide cerebral:** es caracteritza per l'acumulació de β -amiloide a les parets vasculars especialment de les arterioles predominantment de les leptomeninges i de l'escorça. No és freqüent que s'acumuli a les vènules

o als capil·lars. Aquests cúmuls provoquen l'engruiximent de la paret vascular, pèrdua de cèl·lules de la musculatura llisa i extravasació de proteïnes plasmàtiques. Els microateromes i les microhemorràgies sovint són conseqüència de l'angiopatia amiloide. Poden causar isquèmies i grans hemorràgies.

3. **SVD hereditària:** són un conjunt de malalties d'origen genètic poc freqüents. Un exemple és la malaltia CADASIL caracteritzada per mutacions al gen *NOTCH 3* que fan que la proteïna s'acumuli a les cèl·lules musculars llises causant la seva degeneració (Mestre H et al., 2017). Aquesta alteració causa accidents cerebrovasculars recurrents en edats joves i deteriorament cognitiu que pot conduir a demència.
4. **SVD inflamatòria i immunològica:** la vasculitis és un conjunt de malalties que estan causades per la inflamació dels petits vasos. La inflamació de la paret dels capil·lars pot causar isquèmies i hemorràgies amb les conseqüents implicacions vasculars que suposa això en demència. Exemples de malalties que ho poden produir són la granulomatosi de Wegener o la síndrome de Churg-Strauss.
5. **SVD per col·lagenosi venosa:** la col·lagenosi venosa és una malaltia del teixit conjuntiu on s'acumula el col·lagen tipus I/III a la paret de les venes especialment les venes periventriculars, causant leucoaraiosi i, per tant, també s'associa a demència (Brown WR et al., 2002).
6. **Altres tipus de SVD:** són tot un conjunt d'alteracions vasculars que no es poden encabir en cap altre grup. Exemples són l'angiopatia posterior a la irradiació o la degeneració microvascular no amiloide en l'Alzheimer.

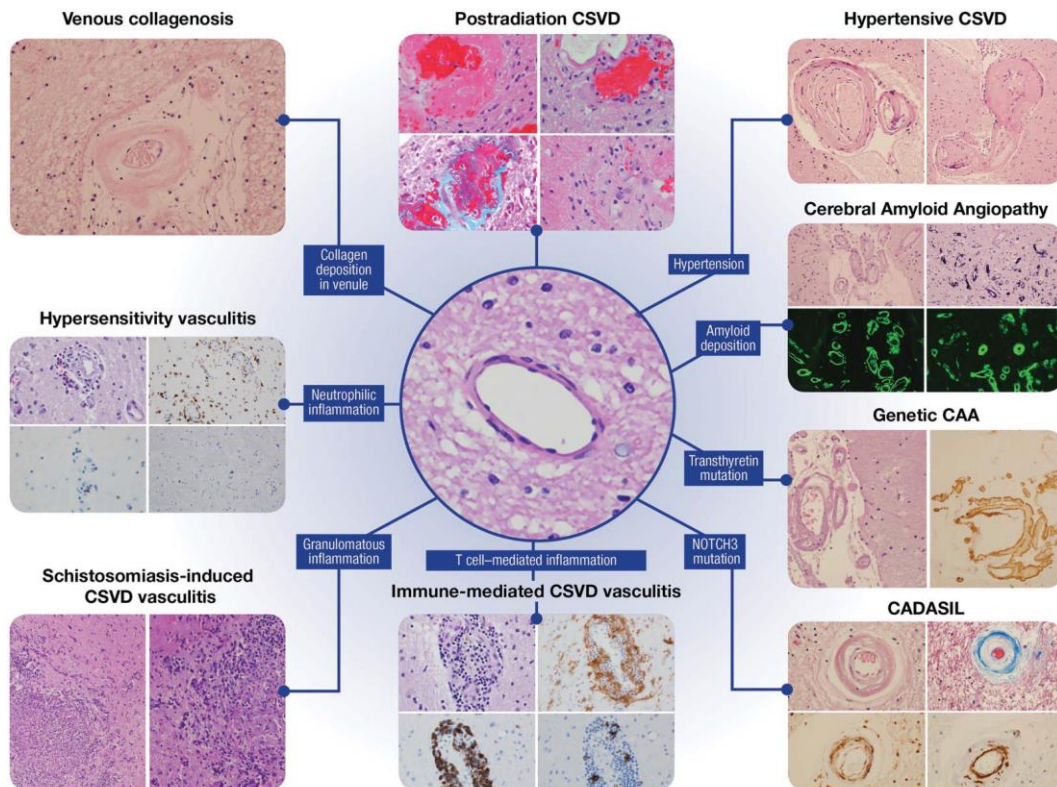


Figura 17. Lesions patològiques característiques de la malaltia de petit vas. Extret de Cannistraro et al., 2019.

Les formes més comuns de lesions vasculares que donen lloc a la malaltia de petit vas són les causades per factors de risc vascular com l'arteriosclerosi, l'angiopatia amiloide i les formes hereditàries d'origen genètic, la resta de lesions són poc freqüents (Cannistraro RJ et al., 2019).

La causa més comuna de SVD són els petits infarts lacunars que causen disruptions en les fibres de substància blanca provocant alteracions conductuals. Les alteracions a la substància blanca poden detectar-se mitjançant tècniques de MRI, com ara, la imatge per tensors de difusió (DTI) i així, ajudar al diagnòstic de la malaltia.

5.3.MALALTIA DE GRAN VAS

L'íctus és una malaltia cerebrovascular causada per una reducció sobtada del flux sanguini cerebral (Rothwell PM et al., 2011). Existeixen dues grans causes d'íctus: l'íctus isquèmic i l'íctus hemorràgic. El 80% dels casos d'íctus són d'origen isquèmic, on es forma un coàgul que oclou un vas sanguini, impedit el correcte subministrament sanguini al parènquima, i el 20% restant correspon a l'íctus hemorràgic, on es trenca un vas sanguini que condueix al vessament de la sang al parènquima, dificultant el

subministrament sanguini. La incidència de les dues causes d'ictus varia segons el país, sent, per exemple, els ictus hemorràgics més freqüents a Àfrica (O'Donnell MJ et al., 2010). L'ictus és la tercera causa de mort al món i la principal causa de discapacitat en adults (Lee S et al., 2011). S'ha millorat molt en el tractament de l'ictus i, per això, cada cop són més importants les seves seqüeles (Rothwell PM et al., 2004).

La demència post-ictus és una entitat clínica que defineix qualsevol tipus de demència que aparegui després de patir un ictus. Aquest tipus de demència té una etiologia complexa perquè inclou alteracions vasculars, alteracions neurodegeneratives i processos mixtes. La probabilitat de desenvolupar demència després d'un ictus depèn de la localització, el volum de la lesió, el dany neuronal associat i de la recurrència de la malaltia. La demència post-ictus es classifica, en funció de les lesions vasculars detectables per neuroimatge, en tres tipus tal i com es mostra a la Figura 18:

- **Demència de tipus I:** demència associada a l'oclusió d'una artèria gran com a conseqüència d'un aterotromboembolisme, un cardioembolisme o coàgul que es forma a una artèria fora del cervell i viatja al cervell per produir un embolisme. Representa el 20-40% dels casos. Els factors de risc d'aquest subtipus són: hipertensió, aterosclerosi, malaltia carotídia, cardioembolisme i malalties cardiovasculars.
- **Demència de tipus II:** normalment inclou lesions per aterosclerosi, lipohialinosi, hipertensió, arteriosclerosi o angiopatia amiloide o per col·lagen. Representa el 40-50% dels casos. Els factors de risc d'aquest subtipus són: hipertensió, diabetis, hiperlipèmia, hiperhomocisteïnèmia, malaltia renal crònica, infeccions i apnea obstructiva de la son.
- **Demència de tipus III:** està causada per infarts amb localitzacions estratègiques com el tàlem, l'hipocamp i inclou factors de risc com el cardioembolisme, o la malaltia de petit vas. És el tipus menys freqüent perquè representa el 10-15% dels casos.

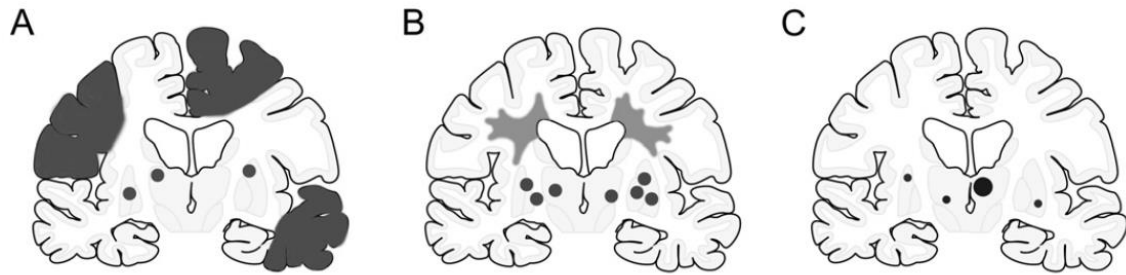


Figura 18. Localització dels infarts o canvis tissulars patològics associats a demència post-ictus. Part grisa fosc: part de l'escorça afectada, part grisa clara: regions de la substància blanca afectada i cercles negres: microinfarts. Extret de Kalaria RN et al., 2016.

Haver patit un ictus duplica el risc a patir demència (Allan LM et al., 2011). És freqüent que després de patir un ictus, hi hagi una davallada cognitiva. La demència post-ictus no és el mateix que les alteracions cognitives transitòries (deliri post-ictus) que sovint apareixen en la fase aguda de l'ictus (Kalaria RN i Mukaetova-Ladinska, EB., 2012) i desapareixen amb el temps. La demència post-ictus correspon a una malaltia permanent, per exemple, en persones de menys de 50 anys, el 50% continua presentant alguna alteració cognitiva als 10 anys de patir l'ictus (Schaapsmeeders P et al., 2013). Els pacients que pateixen diferents episodis d'ictus al llarg de la vida, tenen un risc incrementat a patir demència (Prencipe M et al., 1997)

6. FACTORS DE RISC DE DEMÈNCIA

No existeix cap tractament per aturar la progressió de la demència o revertir-la, per aquest motiu és important la prevenció, actuant sobre els factors de risc. D'entre tots els factors de risc a patir demència, hi ha un conjunt sobre els que no es pot intervenir (factors de risc no modificables) i altres sobre els que les intervencions ajuden a reduir el risc a patir demència (factors de risc modificables).

La importància dels factors de risc de demència no és la mateixa, per exemple, entre els factors de risc no modificables hi ha clares evidències de que l'edat o la predisposició genètica influeixen en el desenvolupament de demència, mentre que hi ha certa controvèrsia sobre l'efecte del gènere en el risc a desenvolupar demència (Podcasy JL i Epperson CN, 2016). La diabetis, la hipertensió, el tabaquisme, la hipercolesterolèmia, el sedentarisme o la reserva cognitiva són alguns exemples de factors de risc modificables front els que es poden dissenyar estratègies de prevenció primària o secundària. D'entre tot els factors de risc modificables la hipertensió és un dels més importants en demència (Iadecola, 2014).

6.1. ENVELLIMENT

Amb l'edat, es produeixen un conjunt d'alteracions que comporten un declivi progressiu de les capacitats físiques i mentals, augmentant la predisposició d'emmalaltir o agreujant les seves conseqüències.

L'envelliment no afecta a tots els òrgans al mateix temps, un dels primers sistemes en alterar-se és el sistema circulatori. L'envelliment de la vasculatura és un procés biològic que es caracteritza per un conjunt de canvis en l'estructura vascular que condueixen a la rigidesa de les parets arterials produint un canvi funcional a la vasculatura (Kucharska-Newton AM et al., 2019).

L'envelliment vascular provoca estrès oxidatiu, disfunció mitocondrial, inflamació crònica, inestabilitat genòmica, senescència, alteracions epigenètiques, pèrdua de la homeòstasi proteica i disfunció cel·lular (Harvey A et al., 2016). Tots aquest canvis condueixen a l'alteració funcional de la vasculatura, produint alteracions en la permeabilitat de la BHE, alteracions en el transport vascular i disfunció vasomotora. En

conjunt, tots aquests canvis fisiopatològics provoquen l'aparició de malalties com ara el dany cognitiu vascular (Ungvari Z et al., 2018).

Les alteracions pròpies de l'envelliment de la vasculatura són perjudicials pels diferents components de la NVU, especialment l'endoteli (Figura 19). A grans trets, l'estrès oxidatiu i la inflamació, generen canvis moleculars que produeixen disfunció cel·lular. En l'envelliment hi ha una producció excessiva de radicals lliures d'oxigen (ROS) i una capacitat reduïda de producció d'agents anti-oxidants (Abdelkarim D et al., 2019). L'ambient oxidatiu que es genera amb l'envelliment, altera múltiples mecanismes cel·lulars, com ara la resposta inflamatòria (Camici GG et al., 2015). Així doncs, l'estrès oxidatiu i la inflamació crònica donen lloc al dany cel·lular que caracteritza l'envelliment.

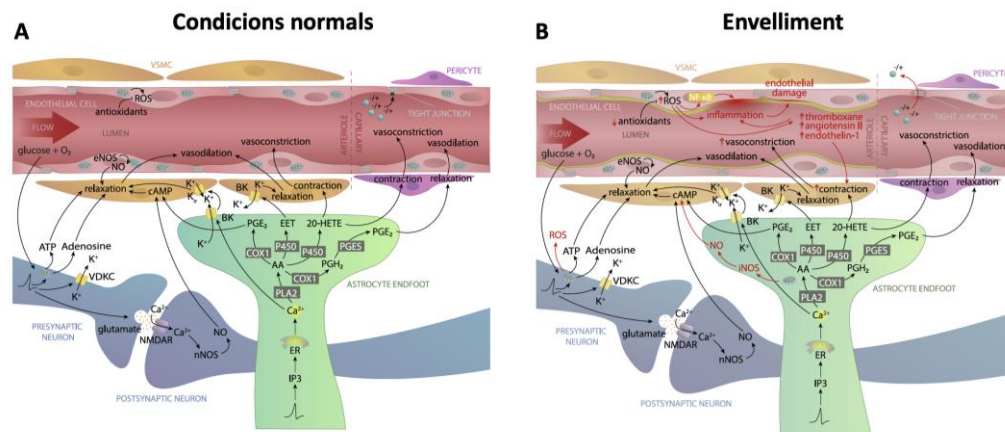


Figura 19. Alteracions cel·lulars i moleculars en l'envelliment vascular. **A)** Resposta vascular en condicions normals. **B)** Resposta vascular en l'envelliment. Adaptat a partir de Abdelkarim D, et al.2019.

Entre totes les alteracions vasculares de l'envelliment, l'estrès oxidatiu, la inflamació i la disfunció mitocondrial condueixen a la disfunció endotelial (Figura 20). Com a conseqüència, es redueix la producció d'òxid nítric (NO) i s'indueix la síntesi de molècules vasoconstrictores com endotelina-1 i angiotensina II. L'endoteli és un dels principals productors de NO, que és molt important en l'acoblament neurovascular que regula resposta vasomotora. Amb l'envelliment, es degrada el glicocàlix que es troba recobrint la porció luminal de l'endoteli, afectant la seva funció de protecció front a microorganismes i la seva funció anti-coagulant. En l'envelliment, es degrada el glicocàlix, es trenquen les unions estretes, hi ha una major expressió de molècules que permeten l'adhesió leucocitària i, finalment, les cèl·lules endotelials moren per

apoptosi. D'aquesta forma incrementa la funció anti-coagulant i anti-fibrinolítica. En conjunt tots aquests canvis alteren els progenitors de cèl·lules endotelials, impedit la regeneració de l'endoteli (Bermejo-Martinez J et al., 2018).

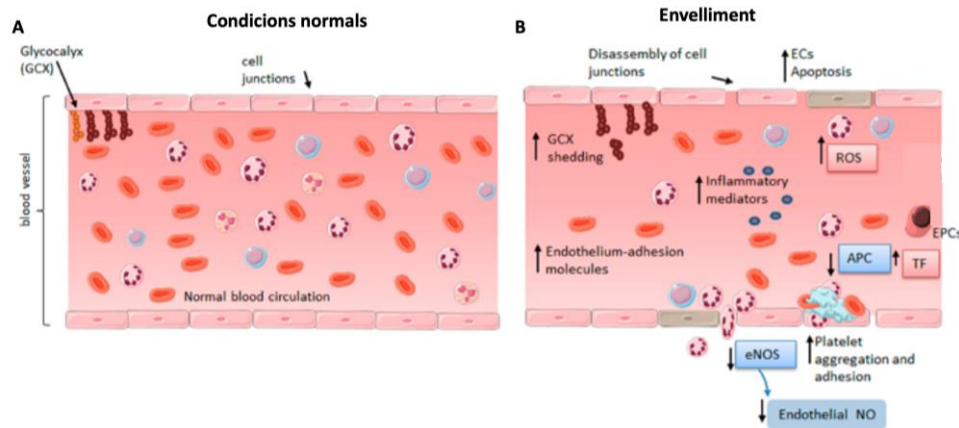


Figura 20. Disfunció endotelial. **A)** Funció endotelial normal. **B)** Alteració de la funció endotelial amb l'envelliment. Extret de Bermejo-Martín et al., 2018.

L'envelliment també produeix alteracions en els components de la matriu extracel·lular (MEC) que també contribueixen als canvis fisiopatològics que es donen en els vasos (Duca L et al., 2016). Els components de la MEC s'acumulen a la membrana basal, s'altera el balanç col·lagen/elastina i hi ha un augment de l'activitat de les metaloproteïnases. Hi ha un increment del col·lagen a la paret vascular i la elastina pateix diferents modificacions, com trencament mecànic, calcificació, carbamilació, glicosilació o peroxidació, de forma que esdevé molt fràgil i s'acaba degradant. En condicions normals, la paret vascular està en continu remodelatge per respondre als canvis metabòlics del teixit en relació al CBF. Aquest remodelatge és promogut per canvis en la composició de la MEC. Aquests canvis es produeixen gràcies a l'acció d'enzims que degraden la MEC, com són les metaloproteïnases (MMP).

Amb l'envelliment també es produeix una disminució de la capacitat angiogènica del teixit (Petcu EB et al., 2010) de manera que es redueix la capacitat de compensació davant del dany vascular cerebral. En l'envelliment hi ha una reducció general de la producció de factors de creixement i dels seus respectius receptors (Figura 21). Aquest fet contribueix a la mort de cèl·lules de la musculatura llisa i a la degeneració vascular.

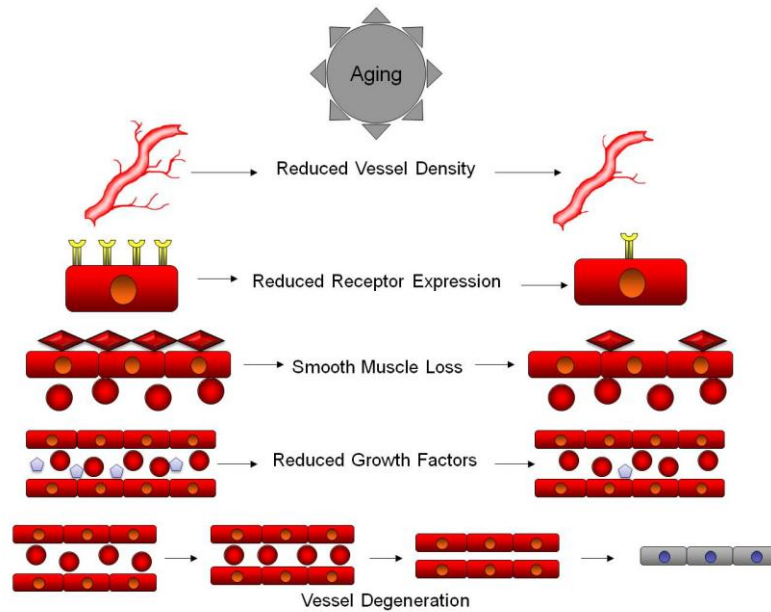


Figura 21. Canvis bioquímics del sistema vascular produïts per l'envelliment. Extret de Duca L et al., 2010.

La degeneració vascular produïda per les alteracions de l'envelliment produeix canvis estructurals que generen, com a conseqüència, un conjunt d'alteracions funcionals, afectant el CBF i l'intercanvi de gasos i nutrients. Per una banda, l'estrès oxidatiu i la inflamació desencadenen necrosi cel·lular produït, entre d'altres, disfunció endotelial. S'alteren també altres components de la NVU, donant lloc a un augment de la permeabilitat de la BHE (Figura 22). D'altra banda, els canvis en la composició de la paret arterial, com l'alteració del balanç col·lagen/elastina, l'augment de la longitud i la tortuositat dels vasos i la reducció de la densitat microvascular (Li Y et al., 2018; Struys T et al., 2016; Toth P et al., 2014), conduiran a incrementar la rigidesa i la dinàmica vascular. La disfunció endotelial, l'augment de la permeabilitat de la BHE i la rigidesa de la paret vascular no només contribuiran a l'alteració del flux sanguini a través de l'alteració de la resposta vasomotora, sinó que també influiran sobre els mecanismes d'intercanvi de gasos i nutrients. D'aquesta manera es veurà afectat el CBF i la biodisponibilitat d'oxigen, generant-se un ambient hipòxic, que afavoreix el desenvolupament de demència.

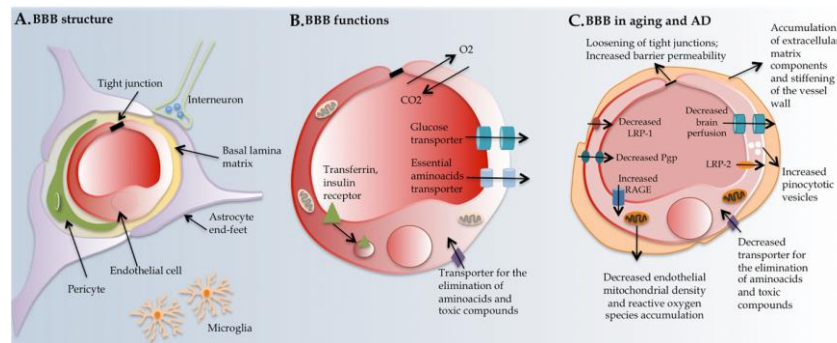


Figura 22. Estructura de la unió neurovascular i com s'altera amb l'envelliment. Extret de Marques et al., 2013.

6.2. ATEROSCLEROSI

L'aterosclerosi és una malaltia inflamatòria degenerativa que produeix un enduriment de la paret vascular com a conseqüència d'alteracions en el metabolisme dels lípids (Figura 23) (Shabir O et al., 2018). L'aterosclerosi s'associa a hipercolesterolèmia, que gairebé sempre es deu a l'acumulació de partícules de LDL en sang. En un intent de fagocitar el LDL, els macròfags esdevenen cèl·lules espongiformes i juntament amb components de la matriu extracel·lular (col·lagen), lípids i colesterol i altres cèl·lules inflamatòries s'acumulen formant plaques d'ateroma principalment a les bifurcacions arterials. L'aterosclerosi es caracteritza per la formació plaques ateroscleròtiques que gradualment produeixen una reducció de la llum arterial, reduint el flux sanguini. La reducció progressiva del flux sanguini a les artèries caròtides i vertebrals pot contribuir al desenvolupament d'ictus i demència (Donnan GA et al., 2008). Existeixen molts factors que influeixen sobre el risc a patir aterosclerosi com ara, algunes isoformes d'apolipoproteïna E (ApoE). El dèficit d'ApoE contribueix a l'increment de partícules de LDL en sang, que s'oxiden com a conseqüència de la resposta inflamatòria i l'estrès oxidatiu que es desencadena.

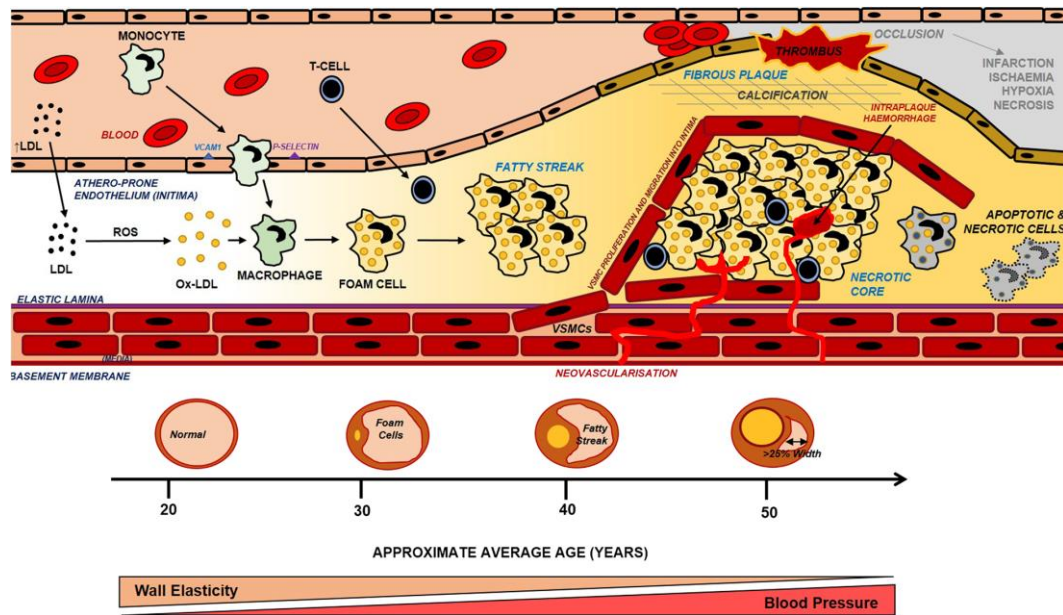


Figura 23. Fisiopatologia de l'aterosclerosi. Extret de Shabir O et al., 2018.

ApoE s'associa a hipercolesterolèmia i hiperlipèmia que, al seu torn, constitueixen un dels factors de risc que poden conduir a aterosclerosi i a demència. A nivell sistèmic es principalment produïda pels macròfags del fetge i forma part de les partícules de quilomicrons que permeten transportar colesterol i triglicèrids als diferents teixits (Figura 24). S'ha descrit que al sistema nerviós central es produïda principalment pels astròcits (Bu G, 2009).

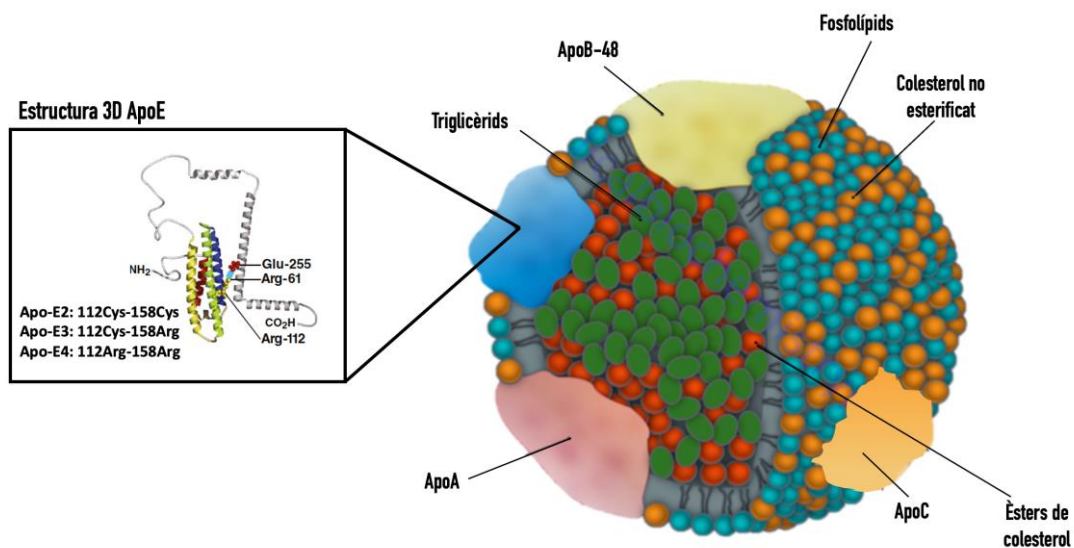


Figura 24. Estructura i composició dels quilomicrons i estructura 3D de l'apolipoproteïna E amb les corresponents isoformes. Adaptat de Mahley RW 2016.

El gen APOE es troba al cromosoma 19 i dóna lloc a una proteïna constituïda per 299 aminoàcids d'una massa molecular d'aproximadament 34 kDa (Farrer LA et al., 1997). La proteïna ApoE té tres dominis: domini N-terminal o domini d'unió als receptors de LDL (residus 136-150), domini frontissa i domini C-terminal o d'unió als lípids (residus 244-272), que determina l'afinitat d'unió als lípids. Al domini C-terminal es produeixen mutacions en els residus 112 i 158 que donen lloc a les tres isoformes que es coneixen (Figura 25): $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$ (Mahley RW, 2016). La isoforma més freqüent és Apo-E3, seguida de Apo-E4 i, en últim lloc hi ha Apo-E2. Mentre que la isoforma Apo-E2 s'associa a una reducció del risc a patir demència, la isoforma Apo-E4 s'associa a un increment del risc a patir demència i deteriorament cognitiu (Berlau DJ et al., 2009).

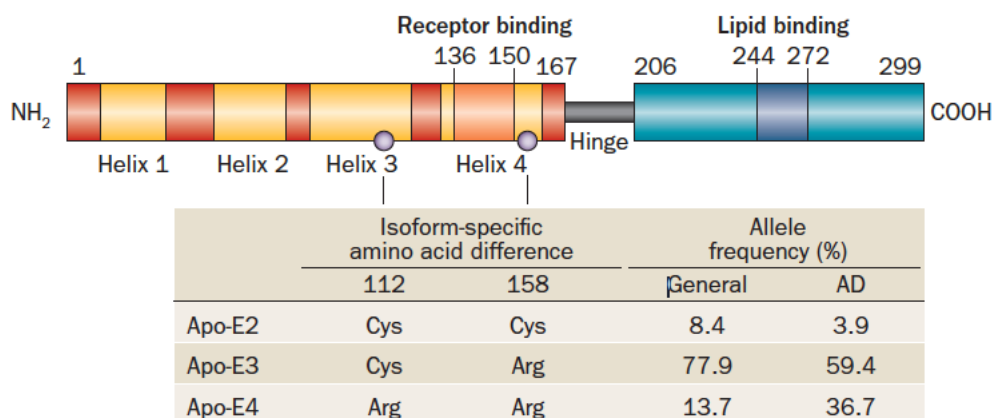


Figura 25. Estructura del gen APOE i isoformes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$. Extret de Liu CC et al., 2013.

S'han descrit múltiples funcions sistèmiques i al sistema nerviós (Figura 26) d'aquesta proteïna. ApoE s'associa a deteriorament cognitiu i malaltia d'Alzheimer (Liu CC et al., 2013). També s'ha associat a ictus i deteriorament cognitiu vascular per la seva implicació en la regeneració de mielina (Herz J i Beffert U, 2000). ApoE promou la supervivència cel·lular i la plasticitat sinàptica (Zhou M et al., 2000). Està implicada en la síntesi i l'eliminació d'A β (Selkoe DJ, 1999; Sinha S et al., 1999), i contribueix a mantenir la estabilització dels microtúbuls (Genis I et al., 1995; Hiesberger T et al., 1999).

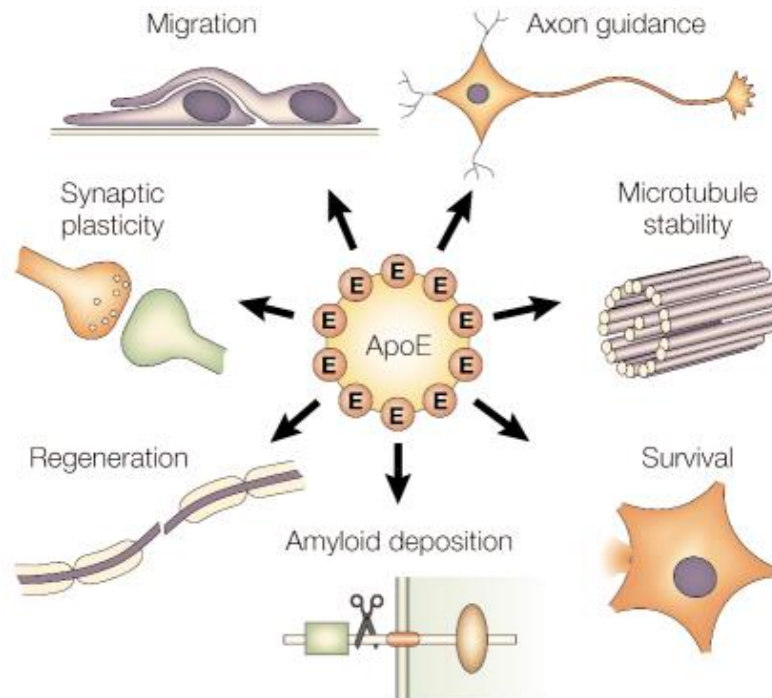


Figura 26. Efectes de l'apolipoproteïna E al cervell. Extret de Herz J and Beffert U, 2000.

6.3.HIPERTENSIÓ

La hipertensió és una malaltia crònica en la que hi ha un increment sostingut de la pressió arterial (≥ 140 mmHg) que causa dany als vasos sanguinis (Faraci, FM 2005). Les alteracions vasculars produïdes per la hipertensió, principalment per estrès oxidatiu (Escobales N i Crespo MJ 2005), poden provocar alteracions cognitives com ara una menor capacitat de raonament, alteracions de memòria, dèficits atencionals i alentiment del processament mental (Elias MF et al., 2012).

Les persones d'edat avançada, tenen una pressió sanguínia elevada per compensar les alteracions pròpies de l'envelliment i poder continuar subministrant suficient oxigen i nutrients a tots els òrgans. Existeix cert debat sobre si la hipertensió és causa o conseqüència de la demència. Dels estudis clínics, s'ha determinat que la hipertensió influeix sobre el risc de patir demència però, mentre que hi ha persones amb demència que tenen una història clínica prèvia d'hipertensió (Skoog I et al., 1996), hi ha altres que la desenvolupen durant el transcurs de la malaltia (Tzourio C et al., 2014).

Un dels òrgans més sensibles a l'increment sostingut de la pressió arterial és el cervell perquè altera els seus mecanismes de regulació del CBF. La hipertensió incrementa el risc a patir demència a través de diferents mecanismes com són la

disfunció microvascular, la disfunció endotelial, la atrofia cortical i l'acumulació d'amiloide.

- Inducció de disfunció microvascular provocant danys a la substància blanca, microinfarts i microhemorràgies. La hipertensió desregula el flux sanguini cerebral provocant alteracions estructurals i funcionals que promouen dany isquèmic (Faraco G i Iadecola C, 2013).
- Alteració de la funció endotelial, afectant així la resposta d'hiperèmia funcional. La hipertensió desequilibra el balanç entre la síntesi de molècules vasoconstrictores i molècules vasodilatadores. La producció de substàncies vasoconstrictores com l'endotelina-1 o l'angiotensina II promouen l'increment de ROS (estrès oxidatiu). El dany cerebrovascular promogut per molècules vasoconstrictores com endotelina-1 i angiotensina-II s'associa a un increment del risc a patir demència (De Silva TM i Faraci FM, 2012).
- Possible desenvolupament d'atròfia cortical. S'ha demostrat que la hipertensió condueix a una reducció del volum de substància grisa selectivament al lòbul frontal esquerre (Celle S et al., 2012).
- Increment de l'acumulació d'amiloide. La hipertensió és també un factor de risc pel desenvolupament d'AD perquè el dany microvascular provocat pels microinfarts i les microhemorràgies causades per la hipertensió poden contribuir a l'augment de l'acumulació d'amiloide i alterar la seva eliminació (Iadecola C, 2014).

Un increment sostingut de la pressió arterial té efectes sobre la estructura dels vasos cerebrals (Scuteri A et al., 2011). La hipertensió indueix remodelatge arterial adaptatiu que pot ser hipertròfic o eutròfic (Figura 27). El remodelatge hipertròfic consisteix en l'engruiximent de la túnica mitja cap al lumen amb el conseqüent reducció de la llum del vas. També hi ha un increment de la mida de les cèl·lules musculars llises i acumulació de molècules de la matriu extracel·lular (MEC) com el col·lagen i la fibronectina. El remodelatge eutròfic consisteix en una reorganització de les cèl·lules musculars llises que comporta una reducció dels diàmetres intern i extern. En aquest cas, no hi ha pràcticament canvi en la mida de les cèl·lules musculars llises. La reducció del diàmetre intern és conseqüència de la reorganització cel·lular i dels components de la MEC, que s'acompanya d'apoptosi a la part més externa de la paret vascular i de la substitució del

components per components fibrohialins. En global el remodelatge per hipertensió produeix una reducció de la llum del vas, un increment de la resistència vascular i un debilitament de la paret vascular.

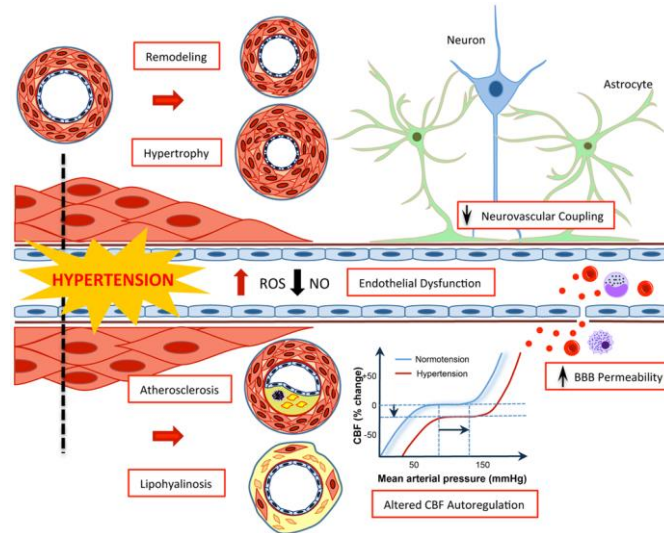


Figura 27. Remodelatge arterial induït per l'increment sostingut de la pressió arterial: remodelatge hipertròfic i remodelatge eutròfic. extret de Faraco G i Iadecola C, 2013.

7. TRACTAMENT DE LA DEMÈNCIA

Les manifestacions clíniques de les persones que tenen demència són heterogènies tant pel que fa al seu inici com per a la seva progressió. A més, els pacients no sempre comparteixen factors de risc, ni els afecta de la mateixa manera a tots. Donada la gran variabilitat de causes i de factors de risc que existeixen, l'abordatge del tractament de la demència es fa difícil. Existeixen diferents intervencions farmacològiques i psico-socials que tenen com a objectiu controlar els factors de risc, reduir els símptomes cognitius i gestionar els símptomes neuropsiquiàtrics, però no hi ha un tractament efectiu que eviti la progressió de la malaltia. Per totes aquestes raons, és necessari el desenvolupament d'eines de diagnòstic precoç, que permetin testar nous fàrmacs.

Una part dels casos de demència es podrien prevenir actuant sobre els factors de risc que predisposen a patir-la (Figura 28). En part, les intervencions farmacològiques i la teràpia psico-social van fonamentalment dirigides a modificar-los.

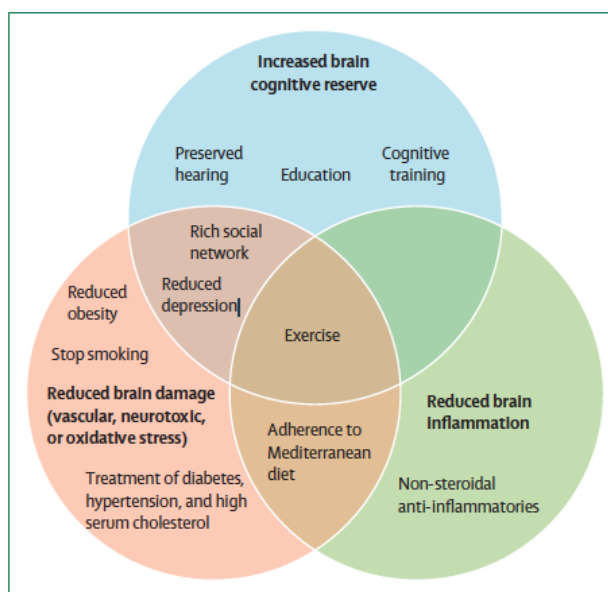


Figura 28. Exemples d'estratègies preventives i els mecanismes cerebrals associats. Extret de Livingston G et al., 2017.

La modificació dels principals factors de risc de demència (diabetis, hipertensió, obesitat, depressió, nivell d'educació, pèrdues auditives, activitat física i contacte social) es traduiria en un gran efecte sobre la càrrega global de la demència que, al seu torn, tindria grans repercussions sobre les despeses socio-sanitàries (Matthews FE et al., 2016).

S'han provat diferents aproximacions farmacològiques per modular factors de risc de demència, com ara fàrmacs anti-hipertensius, anti-inflamatoris no esteroïdeus (NSAIDs), hipoglucemians, estatines, entre d'altres, però només han mostrat un subtil efecte beneficiós alguns fàrmacs anti-hipertensius com la indapemida (McGuinness B et al., 2009).

És necessari fer un bon diagnòstic de la causa de demència i els factors de risc que presenta el pacient per tal de dissenyar el tractament més efectiu possible degut a la manca d'una intervenció que permeti aturar la progressió de la demència. Els tractaments farmacològics que existeixen actualment serveixen per potenciar la funció cognitiva i gestionar la simptomatologia psiquiàtrica.

Existeixen diferents fàrmacs que potencien la funció cognitiva, exemples són els inhibidors de la colinesterasa (donezepil, galantamina i rivastigmina) i el Memantine. Els fàrmacs inhibidors de la colinesterasa contribueixen a restablir el dèficit d'acetilcolina degut a la pèrdua de neurones del nucli basal de Meynert i de l'àrea septal central inhibint l'enzim acetilcolinesterasa (Bartus RT et al., 1982). El fàrmac Memantine redueix la neurotoxicitat produïda per l'excés d'alliberació de glutamat (Greenamyre JT et al., 1988) ja que és un modulador no competitiu dels receptors NMDA (Butterfield DA i Pocernich CB, 2003). Tot i que tenen efectes adversos, la seva combinació és segura i, si no s'administren, poden produir un increment de les manifestacions psiquiàtriques, deteriorament cognitiu i funcional i duplicació del risc d'hospitalització (Howard R et al., 2012)(Howard R et al., 2015).

Els símptomes psiquiàtrics en pacients amb demència s'associen a més problemes per les cures dels pacients i el seus cuidadors, més ingressos hospitalaris, un deteriorament cognitiu més ràpid i major mortalitat (Zahodne LB et al., 2015). S'ha descrit que els fàrmacs anti-psicòtics poden causar dany als pacients amb demència, per això es recomana reemplaçar-los per benzodiacepines (Maust DT et al., 2015; Coupland C et al., 2011). Només en el cas d'angoixa s'administren fàrmacs antipsicòtics. El citalopram es recomana en els casos d'agitació (Coupland C et al., 2011). Els pacients amb demència poden patir també depressió. Només es recomanen els anti-depressius quan el pacient no respon a la teràpia psicològica perquè la depressió en pacients amb

demència és diferent a la depressió com a tal, ja que s'alteren molts sistemes de neurotransmissió, i no sempre coincideixen amb els de la depressió estàndard (Zubenko GS, Moossy J, 1988). Els trastorns de la son també són freqüents en persones amb demència i per la seva gestió es recomanen un conjunt de mesures d'higiene de la son (activitat física i teràpia de llum) combinades amb fàrmacs psicotròpics com les benzodiacepines (Bourgeois J et al., 2014). Per la gestió dels símptomes psiquiàtrics es recomanen intervencions psicològiques i socials per millorar la comunicació (Chenoweth L et al., 2009), teràpia ocupacional i altres activitats físiques (Teri L et al., 2008), teràpia musical (Sung H et al., 2012) i només es recomanen les intervencions farmacològiques quan el risc d'auto-lesió és molt alt i la resta d'intervencions no han estat útils (Ballard C i Howard R 2006).

La manca d'efectivitat dels tractaments per la demència en l'alentiment de la seva progressió ha conduït a estudiar teràpies alternatives o pseudocientífiques, com ara l'entrenament cognitiu, l'exercici, les intervencions psico-socials i els suplementes alimentaris. La reserva cognitiva es pot modelar amb intervencions cognitives (Valenzuela MJ and Sachdev P, 2006), cosa que ha obert un camp d'intervenció en les persones amb demència prometedora (Reijnders J et al., 2013). L'exercici pot ser beneficiós en demència de forma indirecta pels seus efectes beneficiosos sobre diferents factors de risc de demència, com ara l'obesitat, la hipertensió, la diabetis o la funció cardiovascular o de forma directa pels seus efectes neurològics (Jensen CS et al., 2015), com ara l'increment de la neurogènesi, del flux sanguini cerebral i les concentracions de BDNF (Leckie RL et al., 2014). Tot i això, els resultats obtinguts en els estudis longitudinals han estat poc exitosos. Malgrat s'ha demostrat que l'aïllament social incrementa el risc a patir demència (Sundström A et al., 2016), les persones amb problemes de memòria subjectius no milloren amb la intervenció social (Cohen-Mansfield J et al., 2015). S'han desenvolupat nombrosos suplementes alimentaris per complementar la dieta de persones amb demència, que tenen dèficits nutricionals. Molts d'ells tenen efectes secundaris digestius i contenen vitamines com la vitamina B o la vitamina E, amb coneguts efectes antioxidants, que han mostrat efectes en la reducció del risc a patir demència vascular (Cavaliere M et al., 2012) i sobre la progressió

de les lesions de substància blanca en persones amb factors de risc cardiovascular (Gopalan Y et al., 2014).

8. EINES DIAGNÒSTIQUES EN DEMÈNCIA

La demència és una síndrome estretament lligada a l'edat, però evidentment no totes les persones patiran demència a l'envellir. Conèixer els canvis que es produeixen amb l'envelliment al cervell poden ajudar a millorar el diagnòstic i la prevenció de la malaltia. Existeixen factors de risc que predisposen a patir demència com la hipertensió o l'aterosclerosi. Tant la hipertensió com l'aterosclerosi són factors de risc de demència perquè són patologies que alteren la composició i la funció de la vasculatura.

Els grans avenços en el camp de la demència van arribar al segle XX, quan els estudis d'histologia van permetre identificar lesions característiques dels diferents tipus de demències. En aquell moment, s'utilitzaven tests per avaluar la funció neuropsicològica i s'extreien dades que indicaven una probabilitat més elevada que la mitjana poblacional de patir demència. El diagnòstic definitiu no s'obtenia fins que es feia una avaluació histopatològica del teixit post-mortem. Al llarg del segle XX es van desenvolupar diferents tècniques bioquímiques que van permetre determinar la composició bioquímica de les alteracions patològiques característiques de les proteïnopaties. S'han dedicat molts recursos a trobar marcadors bioquímics per cada tipus de demència i, així, facilitar el seu diagnòstic. Els marcadors bioquímics tenen diferents limitacions, com ara que es troben en concentracions baixes en sang i al LCR, i no són exclusius d'una patologia concreta.

Encara que els components al LCR reflecteixen de forma directa els canvis en els processos metabòlics del cervell, la obtenció de LCR es realitza per punció lumbar, un mètode que implica cert risc. Tot i això, hi ha evidències de que biomarcadors com Tau total (tTAU), Tau hiperfosforilada (pTAU) i la forma de 42 aminoàcids del β -amiloide poden identificar de forma eficient la malaltia d'Alzheimer en fases inicials (Hansson O et al., 2006).

Els biomarcadors de demència en sang presenten una concentració encara més baixa que al LCR perquè la BHE és un factor limitant de la seva sortida al torrent sanguini, cosa que limita la estandardització de les seves mesures en sang. No són exclusius

d'alteracions al cervell. Un exemple del que s'ha explicat anteriorment és la proteïna C reactiva, que incrementa en sang en demència (Xu G et al., 2009), però no és un marcador exclusiu d'aquesta malaltia (Yao ZY et al., 2019) perquè també s'incrementa en altres patologies, com per exemple càncer, diabetis o malaltia cardiovascular (Wei M et al., 2017), donat que és un marcador d'inflamació. Per altra banda, hi ha evidències de que no s'altera en la malaltia d'Alzheimer (Teunissen CE et al., 2002)

L'estudi del parènquima cerebral, fa 100 anys, era molt limitat perquè el crani dificultava la obtenció d'informació del que hi ha a l'interior. Per superar aquesta limitació van aparèixer tècniques que, de forma indirecta i invasiva, permeten determinar l'estructura anatòmica del cervell com ara, la arteriografia cerebral o la pneumoencefalografia. L'estudi acurat de l'estructura anatòmica del cervell de forma no invasiva va ser possible a partir dels anys 70, amb el desenvolupament del TAC i de la MRI.

La necessitat de desenvolupar altres tècniques per suplementar la informació que aporten els biomarcadors bioquímics ha precipitat la recerca d'altres eines diagnòstiques. Un altre exemple d'eines diagnòstiques són les tècniques de neuroimatge, que també poden contribuir a l'estudi de les lesions vasculars en l'envelliment, l'aterosclerosi, la hipertensió o la hipoperfusió al cervell. De la mateixa manera que els biomarcadors bioquímics, les tècniques de neuroimatge tampoc són considerades invasives però, a diferència d'aquests, tenen un cost més elevat i menor disponibilitat, però, per contra, aporten informació anatòmica. Són considerades fonamentals en el coneixement de les manifestacions i la etiopatogènia de la demència. Entre les tècniques de neuroimatge més emprades trobem tomografia per emissió de positrons (PET), tomografia d'emissió d'un únic positró (SPECT), tomografia axial computeritzada (TAC) i imatge per ressonància (MRI).

El PET és una tècnica d'imatge analítica que es basa en el marcatge de compostos moleculars mitjançant radioisòtops, per obtenir imatges i mesurar canvis en processos biològics. Els principals emissors de positrons utilitzats són: Cu, Zn, Br, Rb, I, P, Fe i Ga (Phelps ME, 2000). Tot i que existeixen marcadors de PET per la malaltia d'Alzheimer com, per exemple, el FDG-PET que detecta una reducció en la captació de glucosa utilitzant 18-fluorodeoxiglucosa (FDG) o 18F-FDG (Cunningham EL et al., 2015), encara

no s'han descrit bons marcadors per la detecció de demència vascular per PET. No obstant, el PET pot ser interessant per descartar altres tipus de demència com la malaltia d'Alzheimer.

Alteracions com canvis en la perfusió cerebral en AD o la formació de cossos de Lewy (agregats d' α -sinucleïna) es poden estudiar mitjançant SPECT. El SPECT és una tècnica d'imatge computeritzada que utilitza radiació gamma per obtenir imatges d'alta resolució de l'interior de l'organisme. És una de les tècniques menys disponible en la pràctica clínica, cosa que la converteix en una eina costosa (Radiü B et al., 2019). La reducció de la perfusió cerebral en AD es pot estudiar mitjançant ^{99m}Tc -HMPAO o ^{99m}Tc ECD (Foster NL et al., 2007; Valotassiou V et al., 2012, 2015) i la reducció de la captació de dopamina al caudat-putamen en demència per cossos de Lewy es pot detectar amb SPECT (FP-CIT) mitjançant el traçador radioactiu ioflupà 123 (^{123}I) (Ishii K, 2020). Tot i que encara no s'han descrit bons marcadors per la detecció de demència vascular per SPECT, aquesta tècnica pot utilitzar-se per descartar altres tipus de demència com la demència per cossos de Lewy o la malaltia d'Alzheimer.

Es necessiten mètodes d'imatge que ens indiquin les alteracions metabòliques i hemodinàmiques, però també anatòmiques d'alta resolució. Les principals tècniques d'imatge que s'utilitzen de forma rutinària en clínica per l'estudi de les alteracions vasculars associades a la demència vascular són el TAC i la MRI. Ambdues proporcionen coneixement anatòmic tant d'estructures del parènquima com de les estructures que envolten el parènquima.

El TAC és una eina diagnòstica per imatge que permet obtenir imatges de l'interior de l'organisme utilitzant radiació, concretament mitjançant rajos X. En comparació a la MRI, el TAC és més assequible, ràpid i econòmic. L'obtenció d'imatges per TAC depèn de la densitat d'electrons i les taxes d'absorció dels rajos X en els diferents teixits. El TAC és útil per detectar la presència de causes de demència tractables, reversibles o modificables (Filippi M et al., 2012; Knopman DS et al., 2001; Masdeu JC & Pascual B, 2008), però té menys resolució espacial i anatòmica que la MRI i, per tant, és menys sensible en detectar atrofia i malaltia cerebrovascular en fases més inicials, particularment a la substància blanca (Román G i Pascual B, 2012).

La MRI té menor disponibilitat, més incompatibilitats (marcapassos i claustrofòbia, principalment) i més quantitat d'artefactes perquè el pacient ha d'estar més temps quiet. La MRI és multimodal, és a dir, una tècnica amb moltes seqüències diferents per estudiar diferents alteracions cerebrals. Aporta més informació del parènquima i de les estructures vasculars perquè té una millor resolució de teixits tous, per la seva capacitat multiplanar. A diferència del TAC, permet estudiar també paràmetres funcionals. La MRI utilitza els canvis induïts per un camp magnètic que altera la posició del spin de l'àtom d'hidrogen en el seu propi eix. El canvi de les propietats dels protons de les molècules d'aigua més la petita diferència en l'energia produïda pel canvi de posició del spin dels protons s'utilitza per fer una reconstrucció 3D del teixit.

Existeixen diferents seqüències de MRI per l'estudi de les patologies cerebrals. Totes elles són importants i aporten informació rellevant per al diagnòstic, el pronòstic o el monitoratge de patologies en un determinat moment de la seva progressió. Entre les diferents seqüències que s'utilitzen en la pràctica clínica i en recerca bàsica hi ha una equivalència, cosa que dóna un elevat poder traslacional a les tècniques de neuroimatge. De fet, les tècniques de neuroimatge es van desenvolupar inicialment per la pràctica clínica i, posteriorment, es van adaptar per als estudis experimentals. A més, permeten fer estudis longitudinals en recerca bàsica on l'animal d'experimentació esdevé el seu propi control. Això permet, per una banda reduir el nombre d'animals necessaris i per una altra augmentar la fiabilitat i potència estadística dels estudis. La malaltia de petit vas, que és una de les causes més freqüents de demència vascular (De Leeuw FE et al., 2001; Pantoni, 2010), és un exemple de malaltia que es pot estudiar per MRI gràcies a la seva multimodalitat. Tal i com es mostra a la Figura 29, les diferents alteracions vasculars es poden estudiar mitjançant seqüències multimodals com les seqüències FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery), T2, T1, SWI (Susceptibility weighted imaging) o DWI (diffusion weighted imaging).

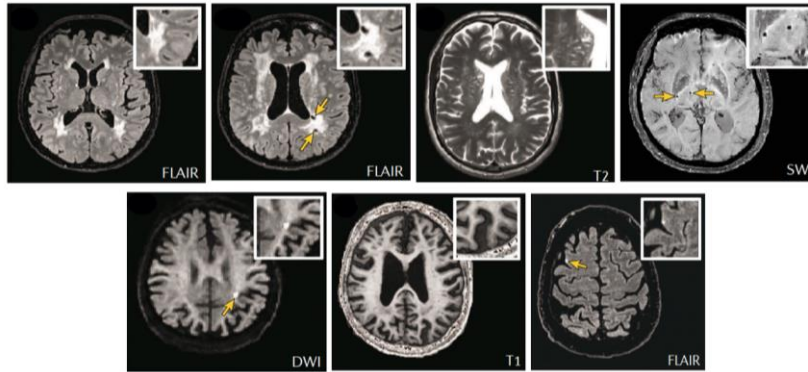


Figura 29. Lesions vasculars produïdes per la malaltia de petit vas detectables per MRI. Extret de Ter Telgte A et al., 2018.

Encara que la causa de la demència vascular és en part desconeguda, es creu que es poden donar alteracions en els principals vasos que irriguen el cervell, causant alteracions en el flux sanguini. Les alteracions del flux sanguini explicarien la formació d'infarts, que es poden detectar utilitzant les imatges amb pes T2, possibles canvis en la microvasculatura, lesions a la substància blanca, que es poden estudiar utilitzant imatges T2* i imatge per tensors de difusió, respectivament.

Per obtenir imatges de MRI experimentals de bona resolució i comparables a la que s'obté en pacients, es necessiten alts camps magnètics, degut al reduït tamany dels cervells en animals d'experimentació, entre d'altres raons.

La angiografia cerebral genera un angiograma, que és una imatge que s'utilitza per estudiar alteracions en el vasos principals que irriguen el cervell, és a dir, vasos grans. Aquestes alteracions sovint són causa d'ictus isquèmics i hemorràgics. La angiografia es pot realitzar amb TAC o amb MRI. Utilitzant el TAC és imprescindible l'administració de contrast. Per MRI, es poden estudiar el vasos sanguinis cerebrals sense necessitat d'injectar un agent de contrast endovenós. La tècnica d'angiografia sense contrast més utilitzada és l'angiografia time-of-flight (TOF) (Gallart, 2014; Miyazaki M & Lee VS, 2008). L'angiografia TOF consisteix en emetre polsos de radiofreqüència per excitar els protons dels teixits. Els protons dels teixits estacionaris es visualitzen saturats degut a la repetició continua dels polsos de radiofreqüència de forma que es redueix la seva intensitat (Figura 30A). Els protons no estacionaris dels teixits (en moviment), com els que constitueixen la sang, no s'exciten i, per tant, no es saturen, generant un senyal d'alta intensitat. La diferència de saturació entre protons de teixits estacionaris i els dels teixits

no estacionaris permet distingir el flux sanguini de la resta de teixits (Figura 30B) i, per tant, l'obtenció d'imatges vasculars contrastades. La intensitat del senyal del vas depèn del gruix del tall, el temps de repetició, del T1 i de la velocitat de flux (Figura 30C).

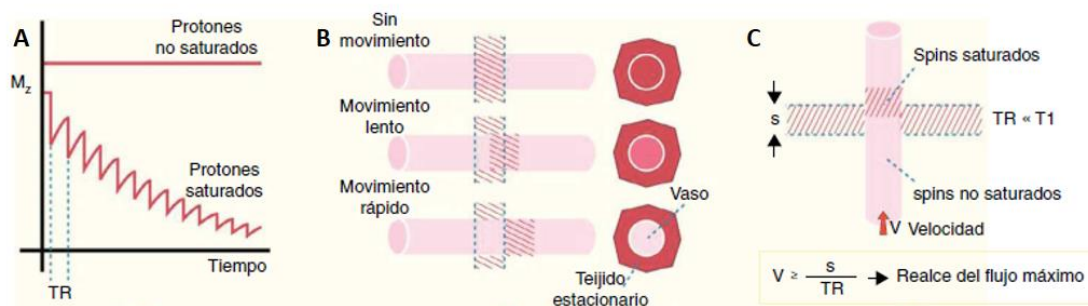


Figura 30. Esquema representatiu de les bases físiques de l'angiografia TOF. Extret de Gallart PV et al 2014.

L'estudi de la dinàmica de la perfusió cerebral es fa principalment per dues vies: injecció del contrast intravenós gadolini o sense injecció de contrast, és a dir, utilitzant les propietats de la sang com agent de contrast (perfusió Arterial Spin Labelling (ASL)). Aporta informació hemodinàmica del CBF a la microcirculació cerebral. Les característiques paramagnètiques del gadolini, contrast endovenós utilitzat en la pràctica clínica, causa augment en la intensitat de senyal al seu primer pas per la xarxa capil·lar cerebral. Amb aquesta informació es poden obtenir mapes de temps de trànsit mig, de volum de sang i de flux sanguini. Breument, la perfusió amb gadolini consisteix en injectar el gadolini intravenós, que passa pel cor i d'aquí al sistema arterial i al cervell, produint l'augment del senyal. A partir del màxim d'intensitat, el gadolini retorna al sistema venós progressivament. D'aquesta dinàmica s'obtenen els mapes esmentats anteriorment. Estudis semblants es poden fer amb TAC però amb menor volum de teixit cerebral i amb importants dosis de radiació. Mentre que la primera seqüència s'utilitza majoritàriament en clínica, la perfusió ASL s'utilitza més en recerca bàsica. La perfusió ASL es basa en realitzar un marcatge magnètic dels protons de l'aigua presents a la sang arterial, que s'utilitzen com a marcadors endogen. Breument, la ASL consisteix en l'obtenció d'una imatge amb marcatge i una imatge control, que tenen els mateixos senyals estàtics però la magnetització de la sang que flueix és diferent. Les molècules d'aigua es marquen utilitzant un pols de radiofreqüència que satura els protons de l'aigua (Figura 31). S'extreu el senyal estàtic restant la imatge marcada i la control. El senyals romanents corresponen a la perfusió, que és proporcional al CBF. En comparació

amb altres tècniques que mesuren la perfusió, la perfusió ASL és ideal per recerca i per estudis clínics perquè no és invasiva i permet realitzar quantificacions relatives i, fins i tot, absolutes de la perfusió.

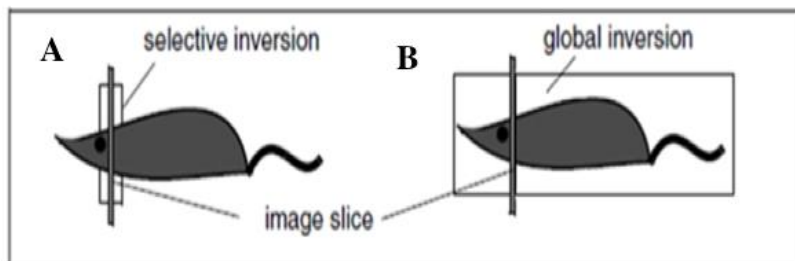


Figura 31. Inversió selectiva i global per la obtenció de la imatge de perfusió ASL. **A)** Primeres sèries T1 utilitzant la inversió selectiva. La imatge invertida coincideix amb el tall de mesura, encara que pot ser una mica més gruixut. **B)** Subseqüents sèries T1 utilitzant la inversió no-selectiva. El volum actiu de la radiofreqüència, el ressonador i el perfil del pols d'inversió determinen el volum d'inversió. Extret del Manual d'aplicació de MRI Bruker.

Alteracions del CBF poden produir infarts i hemorràgies. Les seqüències FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) i les seqüències ponderades en T2 en gradient eco (GE) són especialment útils en l'estudi de pacients amb microangiopatia. La seqüència FLAIR està molt potenciada en T2 amb supressió del senyal del LCR i permet detectar millor les lesions adjacents als ventricles, als espais subaracnoïdeus o als espais perivasculars de Virchow-Robin. La seqüència T2-GE és útil en pacients amb demència vascular perquè permet detectar microhemorràgies cròniques (disminució del senyal T2). Les seqüències T2*, molt utilitzades per estudiar la transformació hemorràgica després de patir un ictus isquèmic (Hermier M et al., 2001), també poden aportar informació que pot contribuir a l'estudi d'hemorràgies. La imatge T2* és una seqüència GE ponderada en T2, útil en la detecció d'hemorràgies perquè detecta depòsits ferromagnètics d'hemosiderina (Figura 32), tant en clínica i com en estudis experimentals per l'estudi d'hemorràgies (Taylor EN et al., 2020).

Possibles canvis en la microvasculatura es poden estudiar mitjançant l'obtenció de mapes Q (Wu EX et al., 2004), que s'aconsegueixen combinant mapes T2 i mapes T2* abans i després de la injecció de contrast de micropartícules de ferro (els detalls tècnics de la obtenció d'aquests mapes s'explicaran a l'apartat de materials i mètodes).

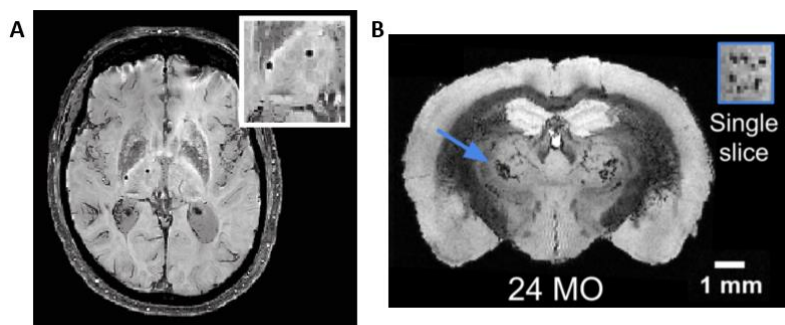


Figura 32. Estudi de microhemorràgies cerebrals per MRI. **A)** Microhemorràgies cerebrals en pacient amb malaltia de petit vas detectables per seqüències T2* W. Extret de (Ter Telgte A et al., 2018). **B)** Microhemorràgies cerebrals al tàlem d'un ratolí de 25 mesos detectables utilitzant seqüències T2*W. Extret de (Taylor EN et al., 2020).

A part de les imatges amb pes T2, la detecció d'infarts en clínica es pot realitzar mitjançant la imatge de difusió (Figura 33). La imatge per difusió detecta la restricció de la normal difusió microscòpica de les molècules d'aigua. En els primers dies després de l'infart (7-14 dies) es genera edema citotòxic, que provoca canvis intracel·lulars i extracel·lulars, causant una restricció del moviment lliure de l'aigua al teixit isquèmic. Aquesta alteració es manifesta com una hiperintensitat a les imatges de difusió i com una hipointensitat al mapa del coeficient de difusió aparent de l'aigua (ADC). En les seqüències T2 spin eco (SE), l'infart es detecta com una zona hiperintensa degut a l'edema. La imatge per difusió és més informativa en la fase hiperaguda de la lesió que la imatge per T2-SE.

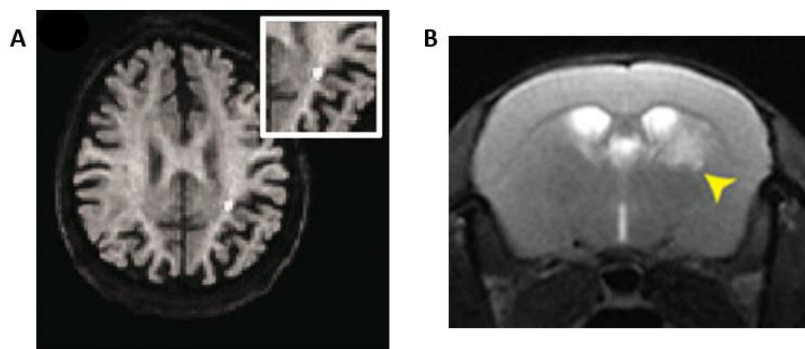


Figura 33. Estudi d'infarts cerebrals per MRI. **A)** Petits infarts subcorticals recents en pacient amb malaltia de petit vas detectables per seqüències DWI. Extret de (Ter Telgte A et al., 2018). **B)** Infart subcortical en un ratolí subjecte a estenosi asimètrica bilateral de l'artèria caròtida (ACAS) . Extret de (Hattori Y et al., 2015).

La leucoaraiosi (del grec leuko = blanc i araios = rarefacció) fa referència a un conjunt d'anomalies de la substància blanca detectables per neuroimatge, que apareixen predominantment a la regió periventricular, especialment en persones d'edat

avançada (Ben-Assayag E et al., 2012; Zagrajek MM i Pokryszko-Dragan A, 2005). La leucoaraiosi s'associa a deteriorament cognitiu i demència vascular (O'Sullivan M, 2008).

Per veure l'afectació de les fibres nervioses, es fa servir una altra tècnica de difusió anomenada imatge per tensors de difusió (DTI) (Le Bihan D, 2003). En estudis en persones d'edat avançada i amb factors de risc vascular, les imatges de DTI mostren lesions isquèmiques a la microestructura de la substància blanca quan encara no són visibles amb altres tècniques d'imatge convencional (O'Sullivan M et al., 2004). El DTI va ser descrit a mitjans dels anys 90 com una eina que permetia avaluar el grau d'organització dels axons in vivo al cervell (Basser P et al., 1994). El principi que governa aquesta tècnica és el moviment brownià de l'aigua (figura 34). En un entorn sense restriccions, l'aigua es mou lliurement en totes les direccions donant lloc a una probabilitat de distribució circular anomenada difusió isotròpica (figura 34A). En la difusió isotròpica, la probabilitat de que les molècules d'aigua viatgin del centre a qualsevol punt extern és la mateixa, sense tenir en compte la gravetat. En un teixit, les cèl·lules limiten el moviment de les molècules d'aigua amb un eix de direcció preferent o tensor (figura 34A). A la substància blanca, fonamentalment composta d'axons recoberts de mielina, els protons de les molècules d'aigua tenen una direcció preferent, s'acostumen a moure al llarg o cap a la part externa (figura 34B). Breument, del DTI s'extreuen diferents paràmetres probabilístics, com l'anisotropia funcional (FA), la difusió mitja (MD), la difusió radial (RD) i la difusió axial (AD), que permeten estudiar la connectivitat estructural. FA és un valor probabilístic que va del 0 a l'1 i que indica el grau d'organització de les fibres, sent valors propers a 0 els que indiquen degeneració axonal (Müller MJ et al., 2005). La MD és una mesura global del desplaçament de les molècules d'aigua. Uns valors alts de MD indiquen menys organització de les fibres, probablement com a conseqüència de pèrdues de neurones, d'axons i d'arboritzacions dendrítiques. AD reflexa la difusió paral·lela a la fibra axonal. Quan els valors d'AD són baixos, podrien indicar dany axonal, menor calibre de l'axó o menor organització de l'orientació de l'axó perquè AD no està influenciat pel procés de mielinització (Song SK et al., 2005). En canvi, el RD reflexa la difusió perpendicular a l'axó i, per tant, està més estretament correlacionat amb la mielinització, de fet, valors alts de RD indiquen menor mielinització (Budde MD et al., 2009).

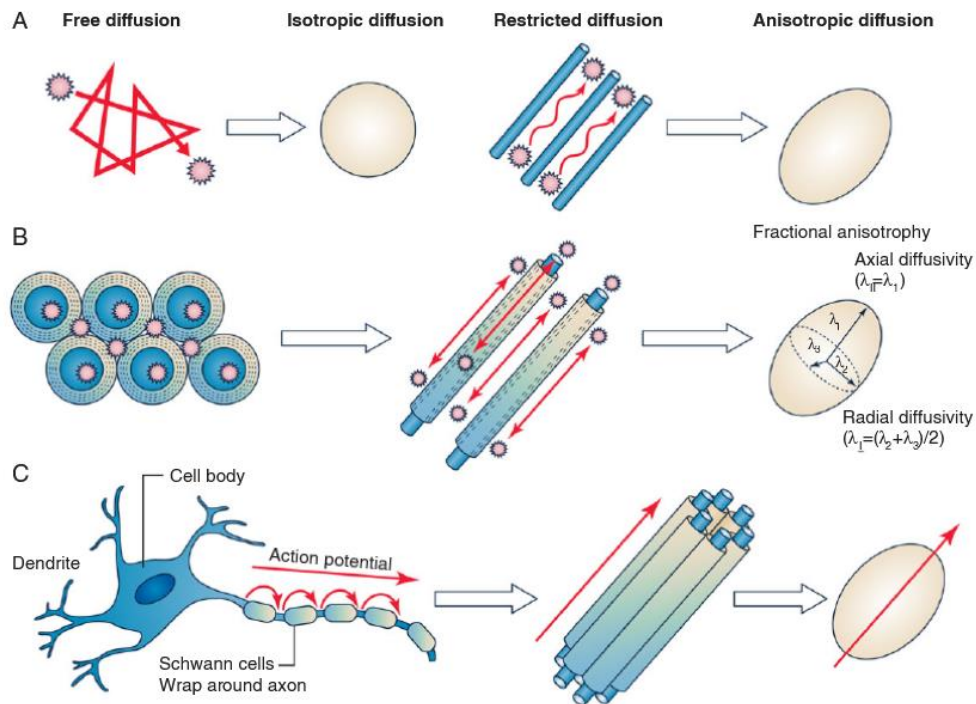


Figura 34. Principis de la DTI com a eina per l'estudi de la connectivitat. **A)** Difusió lliure. El moviment lliure de les molècules d'aigua resulta en una distribució de probabilitat en forma de cercle, que rep el nom de difusió isotròpica. En la difusió restringida, la distribució de probabilitat del moviment de les molècules d'aigua té forma el·lipsoidal, que rep el nom de difusió anisotròpica. **B)** Difusió a la substància blanca. La mielina és una barrera que determina la direcció principal de la difusió de les molècules d'aigua al llarg de l'eix de l'axó (difusió axial) i la probabilitat de creuar l'axó, que és baixa (difusió radial). **C)** Connectivitat funcional. Els paràmetres que s'extreuen del DTI permeten detectar alteracions en l'impuls nerviós entre estructures cerebrals. Extret de (Tsai CY et al., 2019)

En definitiva la MRI és una eina d'alta resolució, translacional, multimodal, no invasiva, que permet detectar lesions característiques de demència vascular en pacients i utilitzar les mateixes seqüències, adaptades en recerca bàsica.

La demència és una síndrome heterogènia complexa en la que les alteracions patològiques s'inicien molt abans de que apareguin els símptomes. La manca d'una eina de diagnòstic precoç dificulta la detecció de forma eficaç aquestes alteracions i, poder, d'aquesta manera, distingir entre els diferents tipus de demències i detectar-les abans que la simptomatologia s'hagi establert. Si s'aconsegueix detectar la demència en estadis inicials, es podran desenvolupar fàrmacs per reduir-ne les conseqüències socio-sanitàries.

9. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

La demència és la cinquena causa de mort i una de les principals causes de discapacitat en adults. Amb l'augment exponencial de l'esperança de vida, s'estima que la quantitat de persones que patiran demència en els propers 30 anys, es triplicarà en tot el món degut a les millores socio-sanitàries. La demència no és només una malaltia que afecta a 36.5 milions de persones al món actualment, sinó que té un gran impacte sobre el sistema sanitari i els familiars. Els recursos econòmics que es dediquen actualment a demència, ja igualen els destinats a malalties com el càncer i les malalties cardiovasculars, entre d'altres.

La demència vascular constitueix la segona causa més freqüent de demència al món en les persones de més de 65 anys. No es coneix del cert la seva causa ni existeix cap tractament efectiu per combatre-la. Només es disposa de tractaments destinats a intentar potenciar la funció cognitiva però que no han resultat ser efectius aturant la progressió de la demència. A més, des del descobriment de la teoria vascular, es creu que el dany vascular també podria estar relacionat amb altres tipus de demències.

Tenint en compte la manca d'un tractament efectiu per la demència, l'envelliment progressiu de la població i la quantitat de recursos socio-sanitaris que es requereixen, cal trobar nous biomarcadors per detectar la malaltia abans que aparegui la simptomatologia i, així, poder testar nous fàrmacs per aturar la seva progressió. En aquest punt els models animals d'experimentació poden resultar ser molt útils per la caracterització de la malaltia i la detecció precoç de biomarcadors primerencs.

Amb aquesta finalitat, en aquesta tesi s'han provat diferents tests per avaluar alteracions associades a demència en fases inicials en models animals de demència. S'han avaluat canvis conductuals associats a demència mitjançant tests de comportament. S'han utilitzat tècniques *in vivo*, com la imatge per ressonància magnètica, *ex vivo*, com la microscòpia amb la finalitat de detectar canvis vasculars associats al desenvolupament de demència en etapes inicials.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Un gran nombre d'assajos clínics han fracassat, en gran part degut a la manca de translació entre la recerca bàsica i la pràctica clínica. En molts casos, l'estudi s'ha limitat a comparar dades de grups de diferents edats, o entre grups afectats versus controls. Proposem un nou enfoc d'aquest tipus d'estudi, de forma longitudinal, afegint els diferents factors de risc que intervenen en el desenvolupament de la DV. Estudiarem els canvis estructurals i funcionals al llarg del temps en animals d'experimentació, i en el curs dels símptomes de la malaltia, sota la influència de diversos factors de risc. La informació de les tècniques d'imatge en els estudis longitudinals dels models experimentals de DV pot indicar nous biomarcadors no invasius per la DV, per avançar en l'estudi de la seva fisiopatologia així com en el diagnòstic precoç i la monitorització de l'efectivitat de noves teràpies. Per respondre a aquesta hipòtesi, ens hem proposat objectius més específics com:

1. Determinar quins canvis vasculars tenen lloc durant el procés d'envelliment. Es farà un seguiment longitudinal de l'evolució de la vasculatura cerebral en una cohort de ratolins des de l'edat adulta (6 mesos) fins a la vellesa (18 mesos) mitjançant tècniques de ressonància magnètica. Els resultats obtinguts amb les tècniques d'imatge es correlacionaran amb els de diferents proves de comportament enfocades a la memòria i l'activitat motora. Finalment es realitzaran estudis histopatològics.
2. Estudiar els canvis vasculars en l'envelliment relacionats amb aterosclerosi. S'utilitzarà els ratolins deficientes en apolipoproteïna E (ApoE^{-/-}) com a model d'aterosclerosi.
3. Estudiar els canvis vasculars que apareixen de forma progressiva en una situació d'hipoperfusió crònica. Es farà servir un model animal d'hipoperfusió crònica mitjançant una reducció progressiva del flux sanguini de les artèries caròtides. Es farà un estudi longitudinal on s'avaluaran els canvis vasculars que es produeixen fins a 2 mesos després de la inducció de la hipoperfusió.

MATERIALS I MÈTODES

Tots els procediments experimentals de la present tesi doctoral s'ajusten a la legislació vigent (Real Decreto 53/2013), segueixen les directives de la Comunitat Europea, i han estat aprovats pel comitè d'ètica (CEEA) de la Universitat de Barcelona (UB) i la Direcció General de Polítiques Ambientals i Medi Natural, Departament de Territori i Sostenibilitat de la Generalitat de Catalunya. Els estudis compleixen amb els principis de cures dels animals de laboratori (publicació del NIH No. 86-23, revisat 1985). Tot el personal que ha participat en els procediments experimentals està en possessió de la titulació oficial per treballar amb animals d'experimentació.

1. DISSENY EXPERIMENTAL

En la present tesi doctoral s'han estudiat els canvis vasculars associats a l'envelliment i a la demència vascular. Es van utilitzar dues soques diferents de ratolins, animals C57Bl6 i animals deficients en apolipoproteïna E (ApoE^{-/-}). Ens vam centrar en tres edats representatives des de la vida adulta a la vellesa dels ratolins com serien 6 mesos, que corresponen a l'adult jove, 12 mesos que equivalen a una edat adulta intermitja i 18 mesos d'edat que representen la vellesa.

Es van presentar l'ús de tècniques que permeten l'estudi longitudinal dels ratolins amb la finalitat de reduir el nombre d'animals per grup. S'han emprat tècniques no invasives de ressonància magnètica (MRI), proves de comportament per fer un seguiment longitudinal dels animals (Figura 35) i, finalment s'ha realitzat un estudi histopatològic emprant un microscopi d'alta resolució spinning disk. Dintre de l'estudi longitudinal, alguns animals s'han sacrificat a l'inici de l'estudi i s'han destinat a microscòpia i MRI ex vivo d'alta resolució.

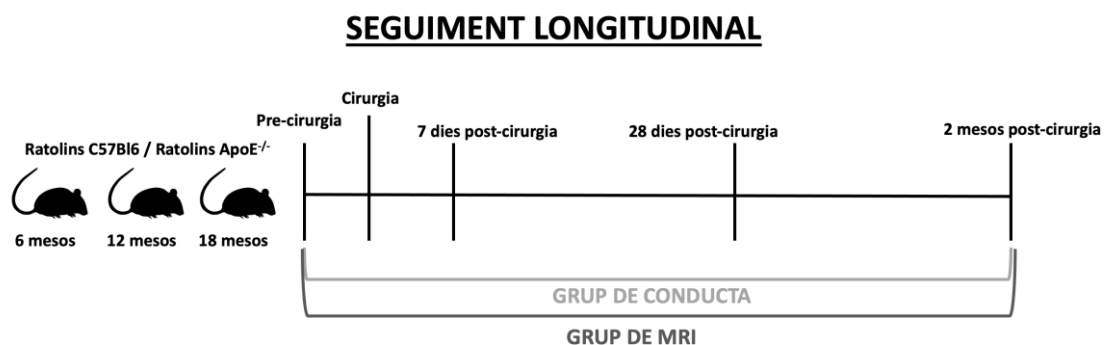


Figura 35. Disseny experimental del seguiment longitudinal de animals C57Bl6 i ApoE^{-/-}. Elaboració pròpia.

En aquest estudi s'han utilitzat un total de 174 animals, tenint en compte les dues soques a les tres edats d'estudi i 41 han mort per diferents raons com ara, el debilitament de l'envelliment, els propis riscos de la operació i/o s'han hagut de sacrificar per malestar o pel desenvolupament de tumors.

S'han utilitzat un total de 92 ratolins C57Bl6. Del total d'aquests C57Bl6, s'han utilitzat 33 C57Bl6 de 6 mesos i 10 han mort per les diferents raons esmentades. S'han inclòs 37 C57Bl6 de 12 mesos, dels quals 9 han mort per les diferents raons esmentades. Els 22 ratolins restants corresponen als C57Bl6 de 18 mesos, dels quals han mort un total de 7 animals.

S'han utilitzat un total de 82 ratolins ApoE^{-/-}. Del total d'aquests, s'han utilitzat 24 ApoE^{-/-} de 6 mesos i 2 han mort per les diferents raons esmentades. S'han inclòs 34 ApoE^{-/-} de 12 mesos, dels quals 4 han mort per les diferents raons esmentades. Els 24 animals restants eren ApoE^{-/-} de 18 mesos, dels quals han mort un total de 9 animals.

2. MODEL ANIMAL

2.1. RATOLINS KNOCK-OUT PER L'APOLIPOPROTEÏNA E

Es van utilitzar ratolins ApoE^{-/-} perquè l'apolipoproteïna E està implicada en inflamació, estrès oxidatiu i en el transport de colesterol. La seva deficiència provoca cúmuls de colesterol en sang (Zhang SH et al., 1992; Ishibashi S et al., 1994), cosa que incrementa el risc a que desenvolupin de forma espontània aterosclerosi en edats avançades (Plump AS et al., 1992; Zhang SH et al., 1992). Per aquest motiu, els ratolins ApoE^{-/-} s'han descrit com un bon model per l'estudi de les malalties neurodegeneratives, com ara la demència (Masliah E et al., 1995; Jawień J et al., 2004; Plump AS i Lum PY, 2009).

El principal avantatge d'aquest model respecte els models convencionals és que desenvolupen aterosclerosi amb el temps d'una forma semblant a la que es dona en humans (Emini Vesseli B et al., 2017), cosa que fa pensar que aquest fet reproduïx el que passa en persones que tenen hipercolesterolèmia (Figura 36).



Model	Perfil lipídic	Distribució i característiques de les plaques (20 setmanes amb dieta occidental)	Pros i contres
Depleció del gen ApoE 	Colesterol en plasma: 400-600 mg/dl dieta normal >1000 mg/dl dieta occidental Lipoproteïnes: ↑↑ VLDL ↑ LDL ↓HDL	 Plaques fibroses - Cèl·lules musculars llisses - Matriu extracel·lular - Cèl·lules inflamatòries - Core necròtic	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Desenvolupen aterosclerosi amb dieta normal ● No tenen un perfil lipídic com els humans ● ApoE està implicada en la inflamació → influeix en el desenvolupament de plaques ● No hi ha ruptura espontània d les plaques, trombosi ni complicacions

Figura 36. Característiques del model animal ApoE^{-/-} d'aterosclerosi. Extret de Emini Veseli B et al., 2017

2.2. HIPOPERFUSIÓ CRÒNICA PER ACAS

Una de les causes més plausible de la demència d'origen vascular és la hipoperfusió. Per aquest motiu, s'han descrit nombrosos models d'hipoperfusió cerebral com a eina per comprendre la fisiopatologia subjacent a la demència (Washida K et al., 2019). Existeixen diversos models animals per induir hipoperfusió cerebral en rata i ratolí. En aquest estudi es va utilitzar el model d'estenosi asimètrica de les artèries caròtides (ACAS), que provoca hipoperfusió cerebral de forma progressiva i s'assembla més al que passa en la realitat (Hattori Y et al., 2014).

Breument, s'implanta una microspiral de 0.18 mm de diàmetre intern a l'artèria caròtida comuna esquerra (CCE), que redueix el flux cerebral en aproximadament un 30% i un anell ameroïde a l'artèria caròtida comuna dreta (CCD), tal i com s'observa a la Figura 37. Els anells ameroïdes estan constituïts per un embolcall de titani i un nucli de caseïna que, en anar-se hidratant, van reduint el seu diàmetre intern produint una reducció progressiva del flux sanguini cerebral.

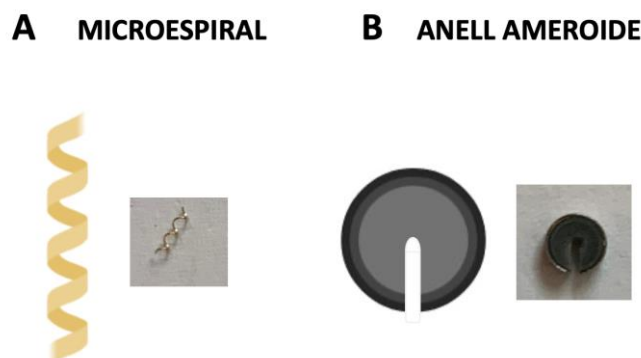


Figura 37. Eines per la reducció del CBF de forma progressiva i sostinguda en el temps en el model d'hipoperfusió ACAS. **A)** Microspiral d'un diàmetre intern de 0.18mm. **B)** Anell ameroïde constituït per un nucli de caseïna que es va hidratant per produir hipoperfusió. Elaboració pròpia.

Per induir hipoperfusió crònica utilitzant el model ACAS cal anestesiàr l'animal amb isoflurà. S'utilitza 4% d'isoflurà per la inducció i al 1% pel manteniment. Es col·loca l'animal al llit d'operar. Se l'injecta buprenorfina 0,01mg/kg com analgèsic i se li afaita el coll per fer un tall a la pell i exposar les artèries caròtides. S'implanta l'anell ameroïde al voltant de la CCD i la microespiral al voltant de la CCE, tal i com s'observa a la Figura 38. Per finalitzar, s'ha de cosir l'animal i despertar-lo en una caixa tèrmica a 37^o.

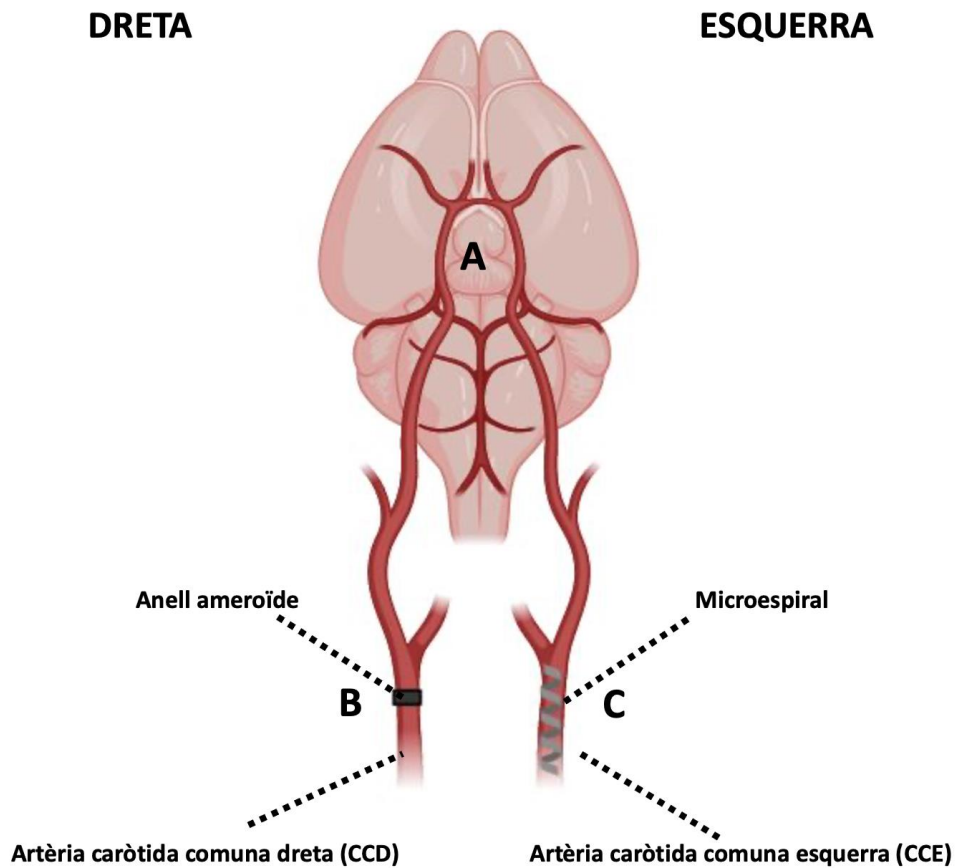


Figura 38. Esquema d'inducció d'hipoperfusió crònica utilitzant el model ACAS. L'esquema s'ha realitzat en posició supina de manera que s'observa el polígon de Willis (A). Mentre que (B) representa la implantació de l'anell ameroïde a l'artèria caròtida comuna dreta (CCD), (C) representa la implantació de l'anell ameroïde a l'artèria caròtida comuna esquerra (CCE). Elaboració pròpia.

Del total d'animals per grup i soca de l'estudi, es van destinar uns pocs animals a ser SHAM. El SHAM del model ACAS consisteix en el mateix procediment amb la diferència de que no s'implanta l'anell ameroïde però es manipula de la mateixa manera l'artèria caròtida comuna dreta. En els animals SHAM, s'implanta una microespiral a la CCE prou ampla com per a no reduir el flux sanguini cerebral, és a dir, una microespiral de 0.5 mm de diàmetre intern.

3. CONDUCTA

S'han avaluat canvis conductuals associats a l'envelliment, aterosclerosi i a la hipoperfusió mitjançant diferents tests conductuals. Mentre que el rotarod i el grip són proves conductuals de caire motor, amb els tests de camp obert i de reconeixement de nous objectes es van poder avaluar alteracions cognitives. Els ratolins han disposat de menjar i beure *ad libitum*. Els test de conducta es van realitzar a primera hora del matí. Es va realitzar una habituació durant 5 dies a l'espai del camp obert i a l'exigència física del rotarod. Al 6è dia es van adquirir les dades basals. A continuació els ratolins van ser sotmesos a la cirurgia ACAS. Posteriorment es va realitzar un seguiment agut (7 dies post-operació) i crònic (fins a 2 mesos després de la cirurgia ACAS). La Figura 39 és un esquema que representa com s'han realitzat els experiments de conducta.

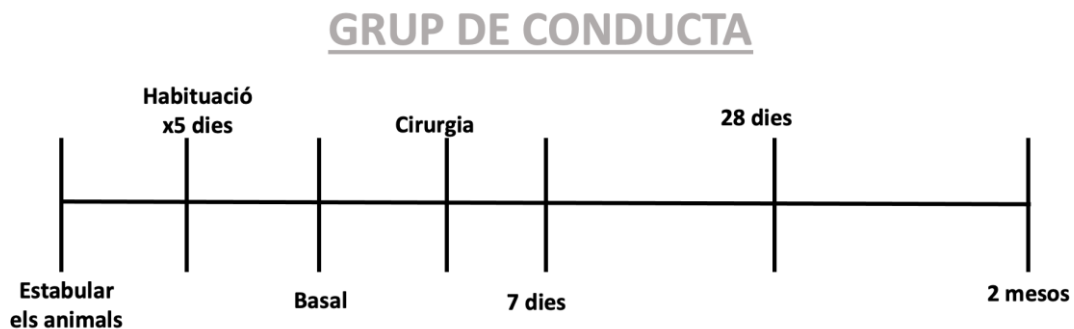


Figura 39. Esquema representatiu del seguiment longitudinal dels canvis conductuals al llarg de l'estudi. Elaboració pròpia.

3.1. ROTAROD

El test de rotarod (Panlab, Harvard apparatus) serveix per avaluar la coordinació motora i l'equilibri examinant, així, l'aprenentatge motor. Durant 5 dies es fa un entrenament que consisteix en ensenyar-los a mantenir-se sobre el carril amb els mateixos paràmetres que s'utilitzaran durant el test i les mateixes tandes de repetició. Es treuen els animals del lloc d'estabulació uns minuts abans perquè s'habituin a la llum. Es col·loca cada animal en un carril de la bobina i s'inicia el test (Figura 40). Els paràmetres que s'han utilitzat són de 4 a 40 rpm amb 5 minuts d'acceleració. Cada animal fa tres tandes de test separades d'un mínim de 15 minuts. S'apunta el temps de latència, és a dir, el temps que triga en caure l'animal.

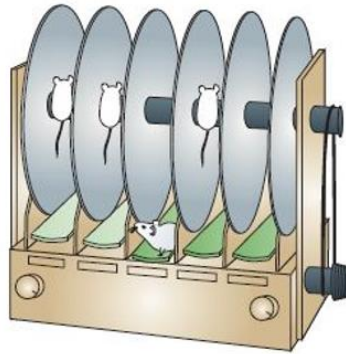


Figura 40. Test rotarod per l'avaluació de la coordinació motora. Extret de Brooks SP i Dunnett SB, 2009.

3.2. TEST GRIP

El test grip s'utilitza per mesurar la força dels rosegadors (Keeling RM et al., 2007), aprofitant que tenen tendència a agafar-se a una barra metàl·lica o una reixa mentre es suspenen de la cua (Figura 41). L'aparell està equipat amb un sensor (Almemo 2450, Alhborn) i un aparell de suspensió (World precision instruments, 1 hunting gate, Hitchin, Hertfordshire, SG4 0TJ, UK). Es va fer servir la barra per mesurar canvis en la força muscular de les potes anteriors i la reixa per mesurar canvis de força en les quatre potes alhora.

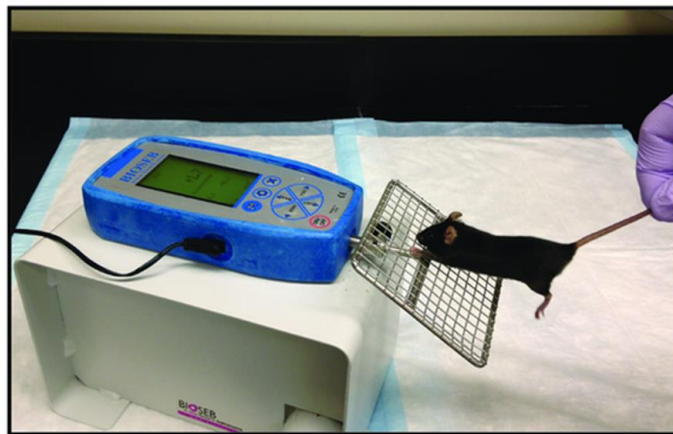


Figura 41. Test grip per avaluar força motora. Extret de Bonetto A et al., 2015.

3.3. TEST DE CAMP OBERT (OF)

El test de camp obert (OF) serveix per avaluar l'activitat motora general i mesurar l'ansietat (Figura 42). Durant una setmana es va realitzar un entrenament d'habitació en les mateixes condicions que el dia del test. S'utilitza una caixa quadrada de 35 cm per cada costat. Es col·loca l'animal dins de la caixa durant 10 minuts il·luminats amb una tènue llum LED zenital. Els dies de test (basal, 7 dies, 28 dies i 2 mesos) es van gravar utilitzant una càmera (Legria CF200, 15x de zoom òptic, HD CMOS, CANON). L'anàlisi dels vídeos es va realitzar mitjançant una eina anomenada MouseMove (Samson AL. et al, 2015).

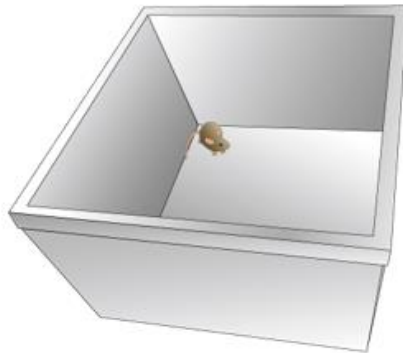


Figura 42. Test de camp obert per avaluar canvis en l'activitat motora general. Extret del centre de bases de dades de Life Science (DBCLS).

3.4. TEST DE RECONeixEMENT DE NOUS OBJECTES (NORT)

El test de reconeixement de nous (NORT objectes és una prova de discriminació que avalua memòria de reconeixement. Els animals es van habituar sense objecte durant una setmana al camp, per reduir-ne l'ansietat. El dia del test, es va gravar l'habitació dels animals utilitzant dos objectes iguals situats en posicions diferents (Figura 43) durant 10 minuts. Dues hores després es canvia un dels objectes amb la finalitat d'avaluar memòria de treball. Posteriorment, es graven durant 10 minuts amb els dos objectes diferents. S'ha utilitzat la càmera Legria CF200 (15x de zoom òptic, HD CMOS, CANON) i una llum tènue LED. Es van avaluar canvis en memòria a curt termini i atenció, utilitzant la eina MouseMove (Samson et al., 2015).

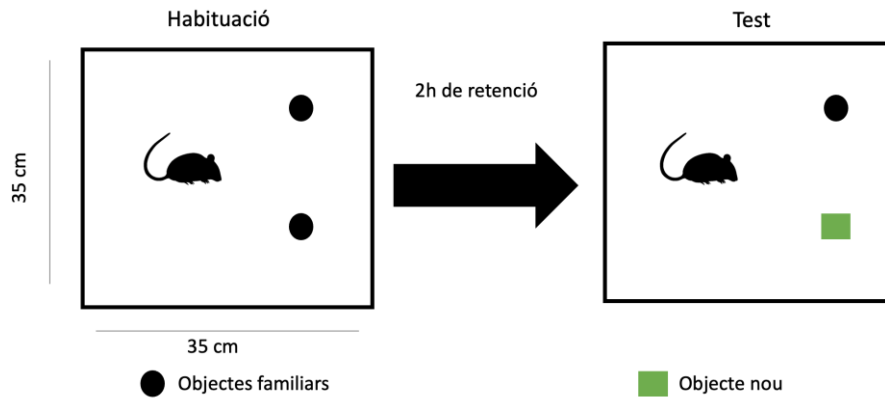


Figura 43. Test de reconeixement de nous objectes per avaluar la memòria de reconeixement. Elaboració pròpia.

4. IMATGE PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA (MRI)

Es va utilitzar la imatge per ressonància magnètica (MRI) perquè té capacitat multiplanar, no és invasiva i permet obtenir imatges d'alta resolució utilitzant múltiples seqüències per poder estudiar canvis patològics associats a una malaltia. A més, permet fer estudis longitudinals amb la finalitat de reduir el nombre d'animals d'experimentació.

Els teixits són sistemes heterogenis que estan constituïts d'una fase líquida on es dissolen components de baix pes molecular i macromolècules. Aquests components estan constituïts majoritàriament per àtoms com ara ^1H , ^{31}P , ^{13}C i ^{15}N , que tenen propietats magnètiques, permetent els estudis per ressonància magnètica. Aquests àtoms s'orienten en un camp magnètic (Figura 44) en direcció a aquest ja que és la orientació de baixa energia (Hanson LG, 2008). Aquesta orientació s'altera aplicant polsos de radiofreqüències. L'energia que s'allibera quan tornen a la seva posició original genera el senyal de MRI, produint patrons d'ecos que es transformen en una imatge, que, al seu torn, permet estudiar la composició dels teixits.

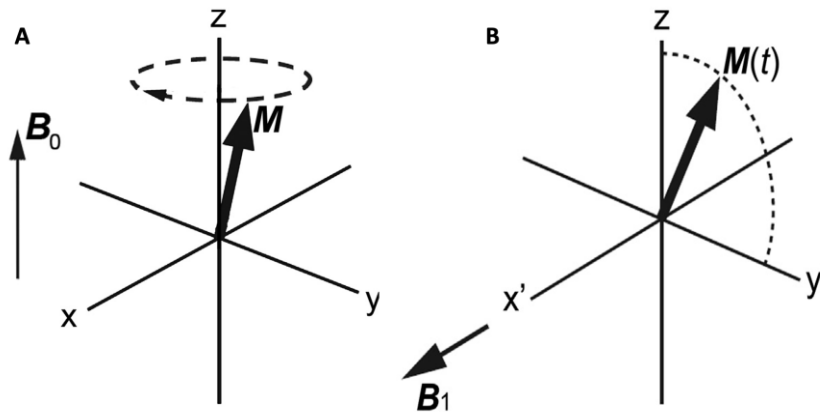


Figura 44. Visualització del vector de magnetització M en diferents condicions. A) Moviment de rotació dins del marc de coordenades en el camp magnètic B_0 . B) Angles de rotació de M dins del marc de coordenades en el camp magnètic induït amb l'aplicació d'un puls de RF. Extret de Mlynárik V, 2017.

Els experiments de MRI es van realitzar al Servei de MRI 7T del centre d'investigacions biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) (Barcelona, Espanya), que van optimitzar les diferents seqüències emprades i van contribuir al desenvolupament de les eines d'anàlisi. Es va utilitzar un imant horitzontal 7 Tesla (7T) (BioSpec 70/30, Bruker BioSpin, Ettlinger Alemanya) equipat amb una bobina de gradient B-GA12 inserida en un sistema de gradients B-GA20S activament protegits. Per la recepció del senyal es va utilitzar una bobina ratolí desacoblada activament d'un ressonador de volum de diàmetre intern de 72 mm.

Els animals es col·loquen en posició supina en un suport de plexiglàs amb un conus nasal per l'administració d'isoflurà al 4% (IsoVet) amb una barreja de gasos (70% de N_2O i 30% de O_2). Els animals es fixen amb una barra de dents, dues barres per les orelles i cinta adhesiva (Figura 45). Per l'adquisició de les imatges, s'ha induït l'anestèsia amb isoflurà al 4% i al 1-1.5 % durant el manteniment (Partecke IL et al., 2011).

Es va fer servir el programa ParaVision 6.0.1 (BioSpec 70/30, Bruker BioSpin, Ettlinger Alemanya) i es van controlar constantment la respiració i la temperatura mitjançant l'equip de control fisiològic PC-SAM32 (SA Instruments, Nova York, EEUU).

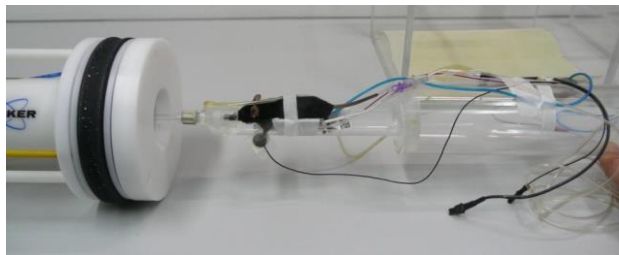


Figura 45. Col·locació de l'animal per l'adquisició d'imatges de MRI. Extret de Partecke IL et al., 2011.

Les imatges es van adquirir en quatre sessions diferents: abans de la cirurgia (estat basal), 7 i 28 dies post-cirurgia, i 2 mesos post-cirurgia. Les primeres seqüències que es van adquirir eren seqüències ràpides i de baixa resolució que serveixen per assegurar la correcta posició del cervell en l'espai magnètic i optimitzar la resolució, la sensibilitat i la uniformitat del senyal de MRI (Gruber B et al., 2018).

Resumint, les imatges de MRI s'han adquirit amb un imant 7T utilitzant el software ParaVision 6.0.1, que alhora, permet el pre-processament de la imatge. El post-processament de les imatges es va realitzar amb Matlab per obtenir els mapes quantificables i la segmentació i quantificació s'han realitzat amb diferents softwares com ITK-SNAP, Amira 5.3 i Matlab (Figura 46).

FLUX DE TREBALL DE L'ANÀLISI D'IMATGES

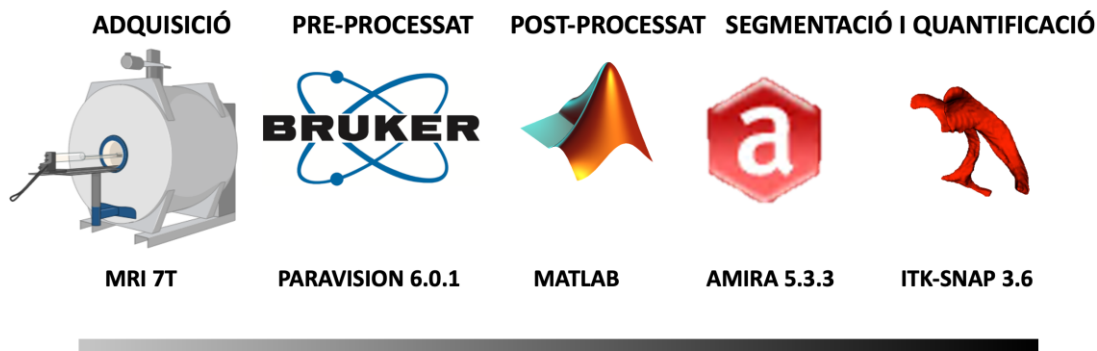


Figura 46. Eines emprades per l'adquisició, el processament, la segmentació i la quantificació de les diferents modalitats de MRI. Elaboració pròpia.

4.1. IMATGE D'ANGIOGRAFIA TIME-OF-FLIGHT (TOF)

L'angiografia TOF és una tècnica que permet estudiar el flux sanguini de les principals artèries que irriguen el cervell (macrocirculació), sense necessitat d'administrar un agent de contrast. Es basa en un fenomen relacionat amb la potenciació dels spins del flux sanguini que arriben al tall concret de la imatge (Gallart PV, 2014).

La seqüència d'angiografia TOF que van utilitzar té un temps d'eco (TE) de 2.1 ms, un temps de repetició (TR) de 14 ms, 2 "averages", una matriu de 256x256x128, un camp de visió (FOV) de 20 x 20 x 25 mm i una resolució espacial de 0,078 x 0,078 mm. Temps d'adquisició: 13 minuts.

Per l'anàlisi de les imatges TOF, es van extreure els mapes en format NIFTI amb scripts de Matlab. Amb Amira 5.3.3 s'han segmentat les artèries d'interès: artèria basilar (vermell), artèria caròtida interna dreta (verd) i artèria caròtida interna esquerra (taronja) per poder mesurar la seva longitud i l'índex de tortuositat (Figura 47). La longitud de l'artèria basilar es mesura des de la unió de les artèries vertebrals (A) fins al polígon de Willis (B). La longitud de les artèries caròtides es mesura des de la bifurcació amb l'artèria caròtida externa (A) fins el polígon de Willis (B). L'índex de tortuositat s'ha calculat dividint la longitud total entre la distància mínima entre A i B (groc).

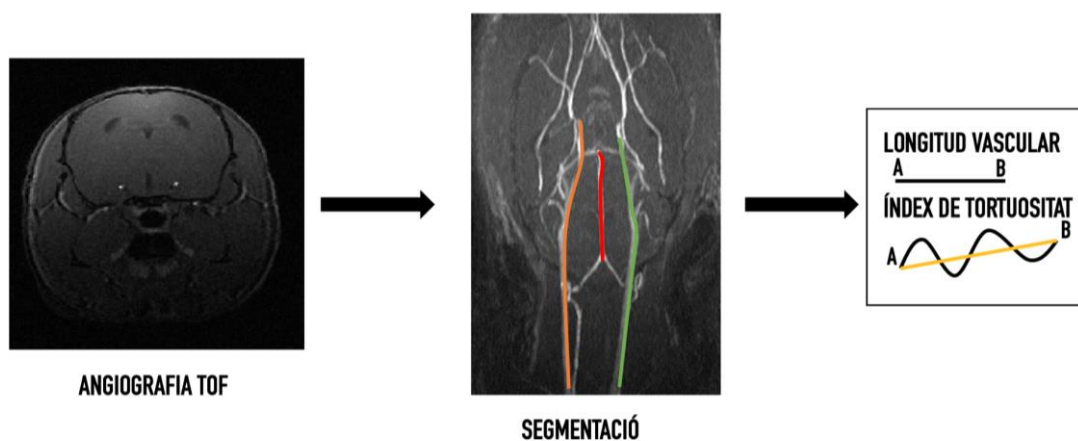


Figura 47. Anàlisi de les imatges d'angiografia TOF. Imatge representativa d'una imatge d'angiografia TOF amb les artèries que es segmenten amb Amira 5.3.3 per obtenir la longitud i l'índex de tortuositat. Elaboració pròpia.

4.2. IMATGE DE PERFUSIÓ ARTERIAL SPIN LABELING (ASL)

La tècnica de perfusió per marcatge arterial (ASL) és una seqüència que permet mesurar de forma relativa el flux sanguini cerebral (rCBF), utilitzant com a traçador endogen les propietats paramagnètiques de l'aigua de la sang arterial. El càlcul del rCBF ve donat per la següent equació:

$$rCBF = \lambda \times \frac{T_{1GLOBAL}}{T_{1BLOOD}} \times \left(\frac{1}{T_{1SELECTIVE}} \times \frac{1}{T_{1GLOBAL}} \right)$$

La seqüència que es va utilitzar té un TE de 18 ms, un TR de 12000 ms, 1 “average”, una matriu de 96 x 96 amb 1 tall de 1 mm de gruix, un FOV de 20 x 20, una resolució espacial de 0,208 x 0,208 mm i s'adquireix en 10 minuts.

Els mapes d'ASL s'han extret amb scripts de Matlab a partir de les imatges crues. Sobre aquesta imatge s'ha fet una màscara del cervell complet mitjançant Amira 5.3.3 per poder extreure els mapes de flux sanguini cerebral relatiu (rCBF). Per poder quantificar canvis en el rCBF en diferents regions d'interès també s'han fet màscares sobre els mapes d'ASL de l'escorça i l'estriat per hemisferis (Figura 48). Per últim, utilitzant scripts de Matlab, s'ha extret el valor de rCBF dels mapes de flux sanguini cerebral relatiu (rCBF).

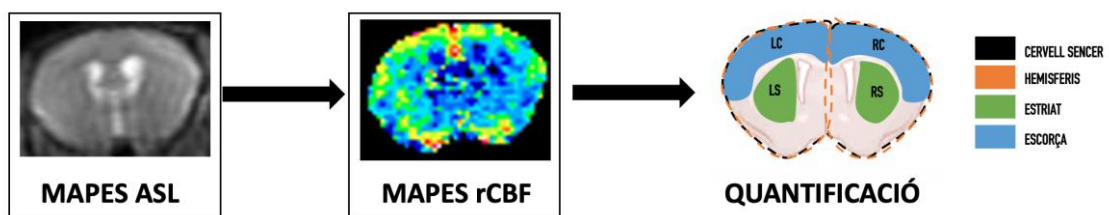


Figura 48. Anàlisi de les imatges de perfusió ASL. Imatge de perfusió ASL representativa a partir de la que s'extreu el mapes de flux relatiu on es realitzen les quantificacions del rCBF. Elaboració pròpia.

4.3. MAPES T2 I MAPES T2*

Els mapes amb pes T2 que s'han utilitzat són seqüències multi-slice multi-echo (MSME) i seqüències multi-slice gradient-echo (MGE). Les primeres donen lloc als mapes amb pes T2 i les segones als mapes T2*. Les dues són seqüències anatòmiques, però el mapa T2*, a més, és molt sensible als canvis de les partícules de ferro de la hemoglobina. Aquestes imatges s'han utilitzat per detectar lesions isquèmiques, estudiar canvis en el gruix cortical i per obtenir mapes que permeten calcular la densitat microvascular *in vivo*.

La seqüència MSME té un TE de 11 ms, un TR de 5000 ms, 1 "average", una matriu de 256 x 256 amb 18 talls de 0,5 mm de gruix, un FOV de 20 x 20 mm, una resolució espacial de 0,078 x 0,078 mm i dura 16 minuts.

La seqüència MGE té un TE de 3,5 ms, un TR de 1274,64 ms, 2 "averages", una matriu de 256 x 256 amb 18 talls de 0,5 mm de gruix, un FOV de 20 x 20 mm, una resolució espacial de 0,078 x 0,078 mm i triga 8 minuts en adquirir-se.

Els mapes ponderats en T2 s'han emprat per la detecció de possibles lesions, així com per l'estudi de les variacions anatòmiques al llarg del temps, principalment a nivell de l'escorça cerebral. Els canvis de gruix a l'escorça s'han estudiat basant-nos en un estudi previ on es segmenta l'escorça cerebral de la regió subcortical, establint dos límits, un límit intern que correspon al cos callós i un límit extern que correspon a la superfície de l'escorça (Lerch JP et al., 2008), tal i com es mostra a la Figura 49.

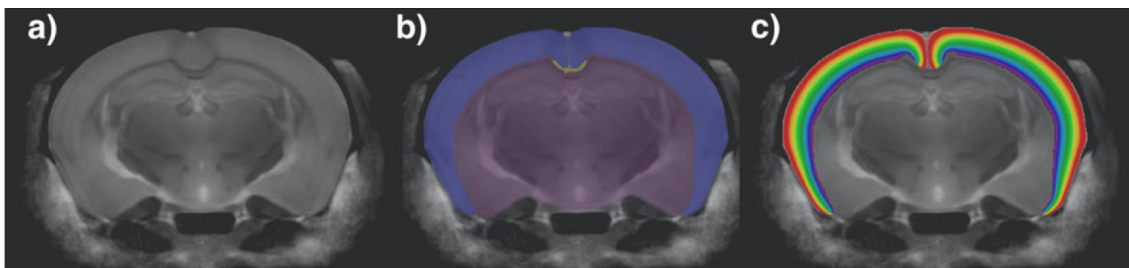


Figura 49. Definició dels límits de l'escorça a partir d'imatges anatòmiques amb pes T2. **A)** Imatge original. **B)** Imatge amb segmentació de l'escorça (blau) i el límit interior (lila). **C)** S'aplica la llei de Laplace per suavitzar el límit exterior. Extret de Lerch JP et al., 2008.

En aquest cas, el gruix cortical s'ha obtingut a partir d'una segmentació manual de l'escorça per hemisferis, utilitzant el software ITK-Snap. La quantificació s'ha fet de manera automàtica en triangulació, tenint en compte totes les tangents que es formen

(Figura 50). Com que el límit interior és més curt que el límit exterior, es podrien introduir errors d'estimació i, per això, només s'agafa un punt interior. El valor resultant es multiplica per a mida del vòxel i es converteix a mm.

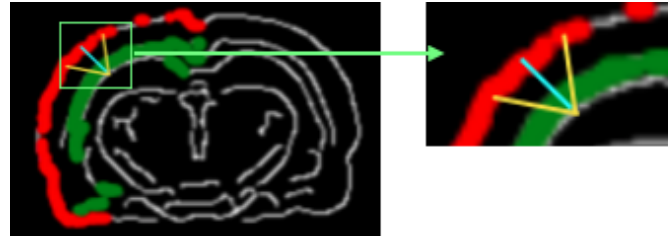


Figura 50. Estimació del gruix cortical a partir dels límits establerts a l'escorça. Elaborat per Agnès del Servei de Resonància Magnètica.

D'altra banda, els mapes T2 i els mapes T2* s'han utilitzat per l'estudi de la microvasculatura cerebral *in vivo* (Cha S et al., 2003). Aquests mapes es van adquirir per duplicat abans i després de la injecció intravenosa a través de la vena femoral de 30 mg Fe/kg de nanopartícules microcristal·lines d'òxid de ferro (MION), un agent de contrast basat en ferro. Aquestes partícules tenen una vida mitja en sang de varies hores, però cal deixar-les al menys 2 minuts perquè es distribueixin homogèniament i poder fer l'adquisició posterior a la injecció (Figura 51).

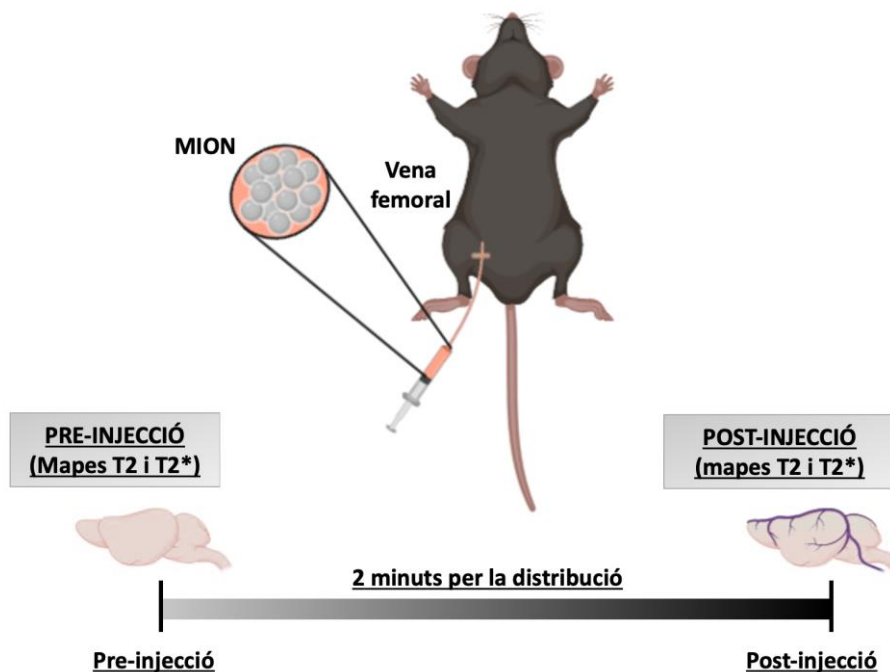


Figura 51. Injecció de les nanopartícules microcristal·lines d'òxid de ferro (MION) a través de l'artèria femoral. Elaboració pròpia.

Tal i com s'ha esquematitzat a la Figura 52, la combinació de les seqüències anteriors permeten obtenir els mapes Q, i a partir d'aquests els mapes N (Jensen JH i Chandra R, 2000). L'índex Q s'estima a partir de la següent equació: $Q \equiv \Delta R_2 / (\Delta R_2^*)^{2/3}$. ΔR_2 i ΔR_2^* són el desplaçament de les taxes de relaxació de l'eco de l'spin i de l'eco del gradient causats per la injecció de l'agent de contrast (Wu EX et al., 2004).

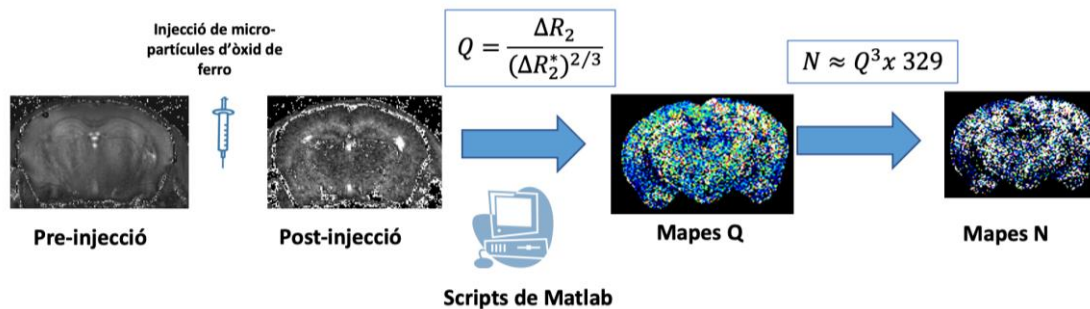


Figura 52. Obtenció dels mapes Q i N pel càlcul de la densitat microvascular. Elaboració pròpia.

L'índex Q és sensible a la densitat microvascular i al coeficient de difusió de l'aigua. Per corroborar sí les mesures *in vivo* es correlacionen amb les mesures *ex vivo* d'histologia, es va transformar l'índex Q a índex N utilitzant el coeficient de difusió de l'aigua de rata (329 s/mm^2), que permet estimar la densitat microvascular (Wu EX et al., 2004). En la present tesi doctoral, es van comparar les dades histològiques amb l'índex Q, tot i que en la literatura científica la major part dels treballs s'han realitzat fent servir el coeficient del cervell de rata. En aquest cas, s'ha decidit utilitzar l'índex Q perquè l'aproximació podria esbiaixar els resultats obtinguts.

Els mapes T2 i T2* obtinguts abans i després de la injecció del contrast s'han processat per obtenir el mapa Q. El primer pas per aconseguir-lo ha estat la extracció dels mapes T2 i T2* de les quatre adquisicions. Aquest procés s'ha aconseguit utilitzant una plantilla T2 i la corresponent màscara del cervell (Muñoz-Moreno et al., 2018). La plantilla T2 es va registrar utilitzant una transformació no lineal amb ANTs (Avants BB et al., 2008) a la intensitat de les imatges T2 adquirides, i, posteriorment, el mateix procediment es va aplicar a la màscara del cervell per ser adaptada al mapa T2.

El segon pas va ser enregistrar les imatges cerebrals segmentades per assegurar una perfecta alineació i evitar deformacions i moviments d'adquisició. La imatge d'intensitat T2-pre va ser utilitzada com a referència per enregistrar els tres volums

restants amb un enregistrament no lineal amb ANTs. Les transformacions obtingudes van ser aplicades als mapes d'imatges cerebrals segmentades.

Les imatges dels mapes registrats van ser suavitzades utilitzant un filtre gaussià amb una sigma de duna desviació estàndard. Els mapes R2 i R2* van ser calculats com l'invers del mapa T2 i T2*. Els valors negatius i infinits del mapa van ser marcats per no ser inclosos en processos posteriors. $\Delta R2$ i $\Delta R2^*$ es van calcular com la diferència entre els mapes abans i després de la injecció de contrast i el mapa Q, utilitzant la fórmula prèviament descrita (Wu et al., 2004). Els valors negatius o valors superiors a 10^4 es van marcar con NaN. Els valors estadístics es van obtenir utilitzant les ROIs de la plantilla utilitzada anteriorment. Els valors NaN no van ser considerats.

4.4. IMATGE PER TENSORS DE DIFUSIÓ (DTI)

La seqüència d'imatge per tensors de difusió (DTI) permet detectar canvis patològics en les fibres cerebrals. Sense restriccions en l'entorn, les molècules d'aigua es mouen lliurement en totes direccions. Al sistema nerviós, el moviment de les molècules d'aigua està limitat per la beina de mielina. La DTI estima la direcció preferent de les molècules d'aigua al sistema nerviós (Figura 53), cosa que permet detectar canvis estructurals en la mielina (Aung WY et al., 2013).

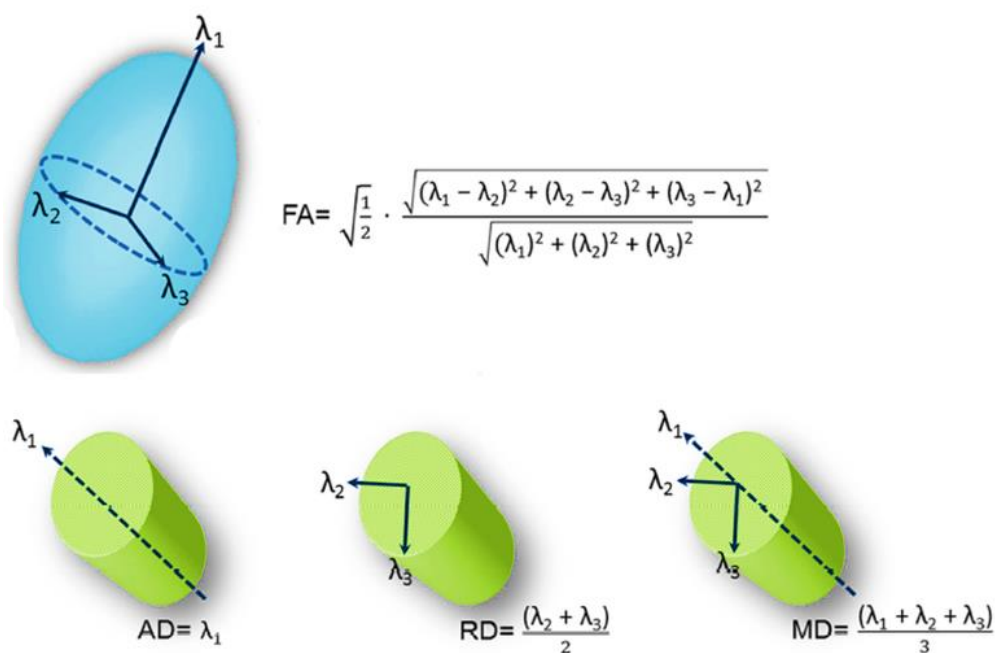


Figura 53. Representació esquemàtica dels mètrics que deriven del DTI. Extret de Desouza DD et al., 2016.

Es van utilitzar dues seqüències de DTI, una seqüència d'alta resolució *ex vivo* i una de menor resolució *in vivo* perquè aquesta segona és més ràpida i, per tant, més pràctica per aplicar *in vivo*. En canvi, subtils alteracions en estructures que presenten poca mielina són més difícils de detectar quan la resolució no és suficientment bona.

La seqüència d'alta resolució *ex vivo* té els següents paràmetres: TE de 33,66323636364 ms, TR de 3000 ms, 1 "average", una matriu de 138 x 84 amb 50 talls de 0,3 mm de gruix, un FOV de 22 x 15 mm, una resolució espacial de 0,159 x 0,159 i un temps d'adquisició de 3 hores i 50 minuts. Les imatges s'obtenen en un camp b0 de 5 que té com a valor màxim 46242.72.

La seqüència *in vivo* té els següents paràmetres: TE de 27,6970 ms, TR de 6000 ms, 2 "averages", matriu de 96 x 96 amb 28 talls de 0,5 mm de gruix, FOV de 20 x 20, resolució espacial de 0.208 x 0.208 i triga 28 minuts. Les imatges s'obtenen en un camp b0 de 5 que té com a valor màxim 2718,02.

Els axons estan recoberts de mielina forcen el moviment de les molècules d'aigua, adquirint una direcció preferent de moviment (anisotropia) (Beaulieu C, 2002). El moviment de les molècules d'aigua als axons segueix una el·lipse 3D definida pel tensor de difusió que, al seu torn, es caracteritza per 3 vectors propis (Σ_1 , Σ_2 i Σ_3). La diagonalització de la matriu, que és una operació matemàtica que consisteix en fer coincidir les direccions ortogonals amb les principals direccions de la difusió, dona lloc a 3 valors propis (λ_1 , λ_2 i λ_3) (figura 53). Dels vectors propis es poden treure quatre mètrics que permetran caracteritzar la direccionalitat de la difusivitat (Desouza DD et al., 2016): anisotropia fraccional, difusivitat mitjana, difusió radial i axial.

1. L'anisotropia fraccionada, que es calcula utilitzant la següent ocasió $FA = \sqrt{\frac{1}{2}}$ ·

$$\frac{\sqrt{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_3 - \lambda_1)^2}}{\sqrt{(\lambda_1)^2 + (\lambda_2)^2 + (\lambda_3)^2}},$$

dóna una idea de la integritat de les fibres de mielina.

2. La difusió mitjana, que s'obté a partir de la següent: $MD = \frac{(\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)}{3}$, s'utilitza per estudiar canvis de cel·lularitat de les fibres de mielina en relació a l'edema i a la necrosi.

3. La difusió axial correspon a l'eix de difusió longitudinal $AD = \lambda_1$, indicant la direccionalitat axial preferent i la difusió radial es calcula com $RD = \frac{(\lambda_2 + \lambda_3)}{2}$ i dóna una idea del grau de mielinització.

Amb scripts de Matlab, s'han extret els 4 mapes dels mètrics de DTI. Es van fer ROIs d'estructures implicades en la cognició com: escorça sensorimotora, cos callós (CC), estriat (CP), hipocamp (HPF), càpsula interna (IC), càpsula externa (EC), , comissura anterior (AC) i fímbria (FB). Les ROIs s'han seleccionat utilitzant l'atles Allen i s'han sobreposat sobre els diferents quatre mapes per obtenir-ne els valors, tal i com s'indica a la Figura 54.

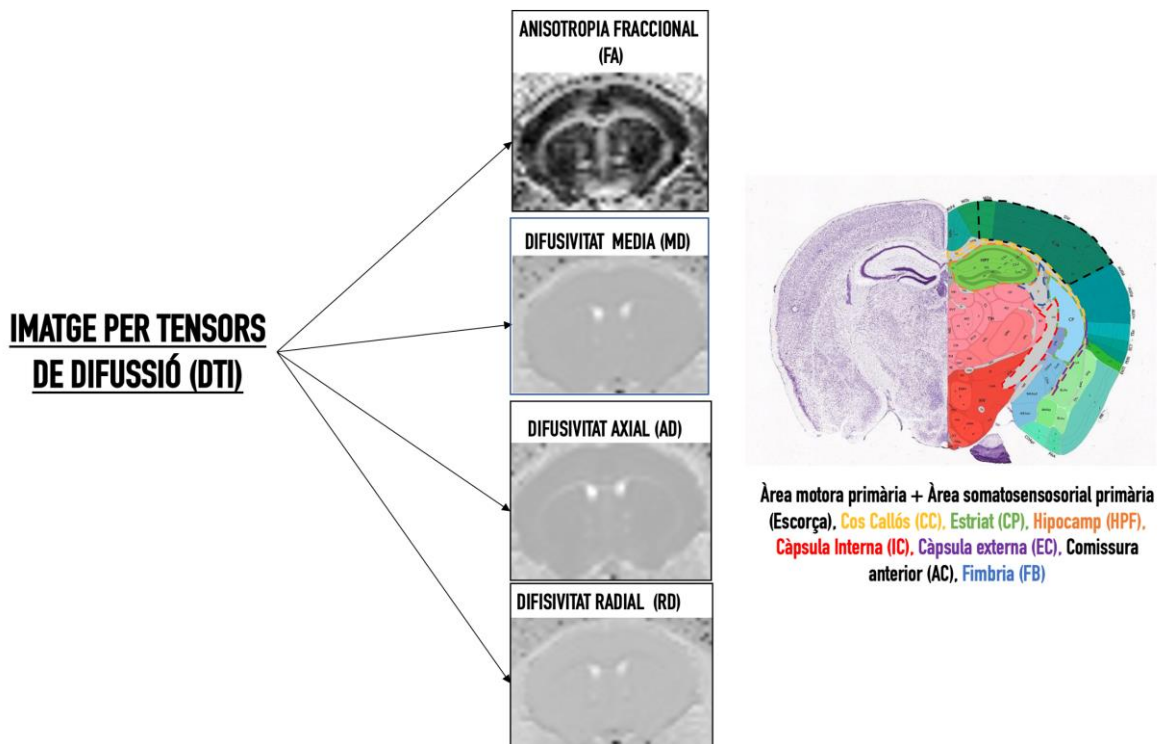


Figura 54. Anàlisi de les imatges per tensors de difusió. Elaboració pròpia.

Els diferents mètrics del DTI aporten informació per detectar canvis patològics a les fibres cerebrals. L'anisotropia fraccional (FA) mesura la densitat cel·lular, vascular, neural i la integritat dels tractes neurals. La difusivitat axial (AD) mesura canvis en la difusivitat axial al llarg de l'eix de difusió. La difusivitat radial (RD) mesura canvis en la difusivitat ortogonal al llarg del principal eix de difusió. Per últim, la difusió mitjana (MD) és la mitjana de AD i RD i reflexa la densitat de membranes, cel·lularitat, edema i necrosi.

Aquests mètrics són útils per detectar l'origen de la patologia de les fibres cerebrals. Per exemple, quan s'altera el moviment en direcció ortogonal indica dany a la mielina que recobreix l'axó i quan s'altera el moviment axial pot ser causa de dany axonal agut (AD es redueix) o dany axonal crònic i dany a la mielina (augment de AD i la RD) tal i com es mostra a la Figura 55.

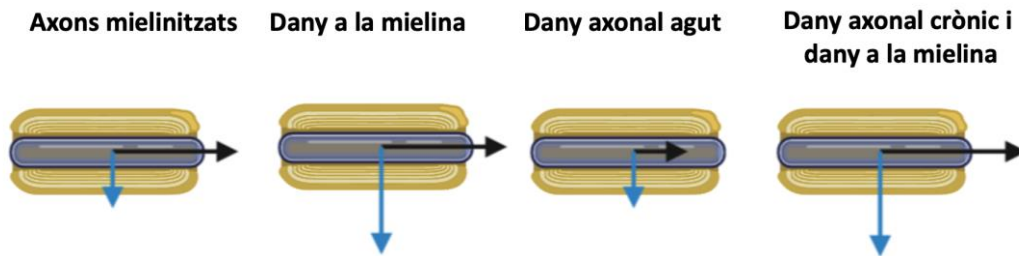


Figura 55. Detecció de canvis patològics en les fibres cerebrals. Adaptat a partir de Aung WY et al., 2013.

5. ESTUDI HISTOPATOLÒGIC

5.1. PROCESSAMENT DEL TEIXIT

Els animals es van sacrificar per perfusió transcardíaca amb 20ml de clorur sòdic (NaCl) 9mg/ml (Frasenius KABI, #Ref 616003.9, #Lot 20LMG016) i 20 ml de PFA al 4%. Es van perfondre també amb 20ml d'una barreja de gelatina de pell de porc (Sigma, Ref#G1890-100G, Lot#SLBW1943) i albúmina conjugada amb fluoresceïna isotiocianat (FITC) (Sigma, Ref#A9771-5G, Lot#SLBP0519V). Es dissolen 0,04g de gelatina en 20ml de clorur sòdic a 45°. Un cop dissolta la gelatina s'abaixa la temperatura per sota de 40° i s'afegeixen 0,02gr d'albúmina-FITC fins que es dissolen en agitació. Els cervells es fixen durant una nit amb PFA al 4%. Un cop fixats, es tallen amb el vibratom. Es van realitzar 2 talls de 2 mm de gruix, que es van destinar a la clarificació per 3DISCO i la resta del teixit es va tallar amb el vibratom a 50 µm, talls que es van destinar per immunohistoquímica. En resum, per tal d'aprofitar al màxim les mostres, es va realitzar dos talls de 2 mm de gruix, que posteriorment es van clarificar per 3DISCO i la resta del teixit es va aprofitar per l'estudi d'histopatologia (Figura 56).

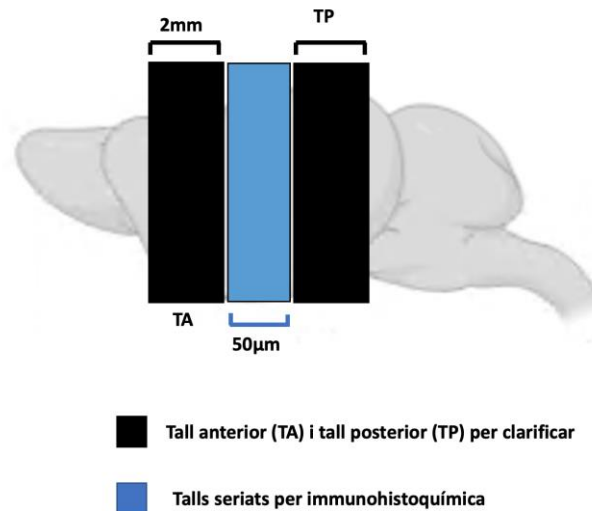


Figura 56. Processament de les mostres per vibratom. Un tall anterior de 2mm de gruix es va destinar a ser clarificat, els talls de la part intermitja se van tallar de forma seriada a 50µm i es van destinar a immunohistoquímica. Elaboració pròpia.

5.2. CLARIFICACIÓ PER 3DISCO

Per la clarificació dels cervells es van fer dos talls de 2 mm de gruix, un anterior i un posterior, que es van clarificar amb la tècnica d'imatges 3D per clarificació d'òrgans mitjançant solvents òrgans o 3DISCO (Ertürk A et al., 2012) tal i com s'observa a la Figura 57.

La clarificació es va realitzar en dos passos principals: deshidratació i clarificació, utilitzant tetrahidrofurà (THF) i di-benzil-èter (DBE) (Lugo-Hernandez E et al., 2017). La deshidratació es va realitzar mitjançant incubacions seqüencials en THF amb una concentració creixent (30%, 60%, 80% i 100%), durant 12h d'incubació. La darrera incubació en 100% de THF es realitza per duplicat. Per clarificar, s'incuben les mostres deshidratades en di-benzil-èter (DBE). El DBE és un agent de clarificació que permet reduir l'índex de refracció d'estructures cel·lulars complexes, que contenen proteïnes i lípids (Genina EA et al., 2010) per equiparar-lo al seu propi índex de refracció, evitant la dispersió de la llum del microscopi. El temps total per obtenir les mostres clarificades per poder fer l'adquisició és d'aproximadament 72h.

L'adquisició s'ha realitzat mitjançant microscòpia confocal d'alta resolució. S'ha utilitzat el microscopi Zeiss del servei de microscòpia de la Universitat de Barcelona (UB) i un microscopi invertit Nikon eclipse Ti2-E (Nikon Instruments) associat a una unitat

spinning disk (Andor Dragonfly) de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB).

Per tots els experiments s'ha utilitzat l'objectiu PlanApo 10x amb una obertura numèrica de 0.45 en sec. Les mostres s'han excitat amb un làser díode de 488 nm. El raig de llum es va acoblar a una fibra multimodal que travessa la unitat Andor Borealis transformant el raig de llum amb un perfil gaussià en una superfície plana homogènia. Des d'aquí, passava a través d'un pinhole disc de 40 μm . Les imatges es van adquirir utilitzant una càmera científica semiconductora d'òxid metàl·lic complementari (sCMOS) d'alta resolució (Zyla 4.2, 2.0 Andor, Oxford Instruments Company) i el software Fusion (Andor, Oxford Instruments Company). Després de l'adquisició i amb el mateix software, les imatges van ser pre-processades amb stiching i deconvulcion. L'anàlisi es va realitzar utilitzant el software d'accés públic ImageJ/Fiji i el software Imaris (Oxford Instruments Company).

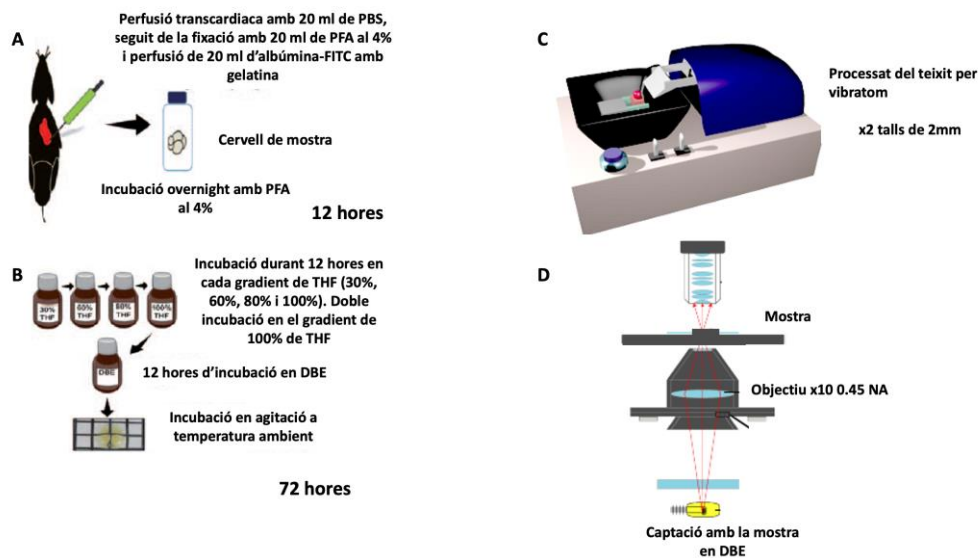


Figura 57. Processament de la mostra per clarificació amb 3DISCO i adquisició mitjançant microscòpia confocal. **A)** Sacrifici, perfusió i obtenció de la mostra. **B)** Clarificació amb 3DISCO. **C)** Talls a vibratòria de 2 mm de gruix. **D)** Adquisició mitjançant microscòpia confocal. Modificat a partir de Lugo-Hernández E et al., 2017.

Les imatges obtingudes són molt pesades i, pel seu anàlisi es requereix d'un ordinador amb un mínim de 128 GB de RAM. Es va desenvolupar una eina d'anàlisi en col·laboració amb el servei de Microscòpia de la UB. S'han fet tres ROIs de 300 x 300 x 300 vòxels en cada regió d'interès utilitzant el Crop 3D de l'ImageJ. Aquestes ROIs es van quantificar utilitzant una macro per ImageJ que permet distingir entre on hi ha teixit i

on no i, així, calcular la quantitat de píxels que contenen senyal de vasos (Figura 58). També es va realitzar un anàlisi del diàmetre dels vasos mitjançant Imaris i la seva funció “Filament tracer”.

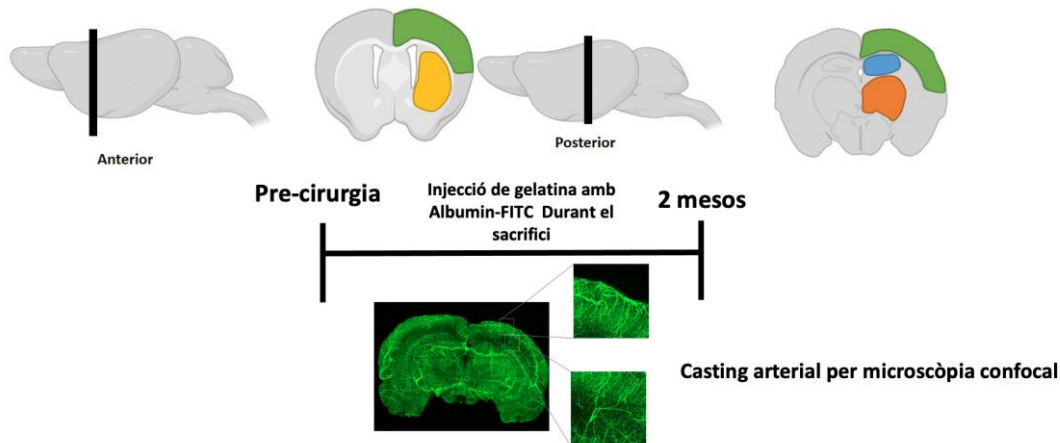


Figura 58. Processament dels cervells clarificats per l'adquisició d'imatges d'alta resolució per microscòpia confocal. Elaboració pròpia.

5.3. IMMUNOHISTOQUÍMICA

Es van fer diferents tincions d'immunohistoquímica com ara per la proteïna bàsica de la mielina (MBP), la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP) i la proteïna adaptadora d'unió al calci ionitzant 1 (Iba-1). Breument, els talls s'han sotmès a tres rentats amb PBS i, a posteriori, s'han bloquejat les unions inespecífiques amb sèrum de cabra (Abcam, #Ref. ab748, #Lot: GR3188160-10) al 3% en PBS amb tritó 2% durant 3 hores per les immunotincions de MBP i GFAP. En canvi, per la immunotinció de Iba-1, es va utilitzar un sèrum d'ase (Abcam; #Ref. Ab7475; #Lot: GR3238411-6) amb les mateixes condicions.

Les mostres es van incubar durant una nit en agitació amb l'anticòs primari MBP (Abcam; #Ref. ab40390; #Lot: GR263996-3) a concentració 1:200, l'anticòs primari GFAP (DAKO; #Ref. Z0334; #Lot: 76531) a concentració 1:200 i l'anticòs primari Iba-1 (FUJIFILM Wako; #Ref. 019-19741; #Lot: CAK1997) a concentració 1:100.

Per últim, es van incubar durant 5 hores amb l'anticòs secundari cabra anti-conill, AlexaFluorPlus 594 (Invitrogen; #Ref: A32740; #Lot: UG288488) a concentració 1:400 les mostres per MBP i GFAP. En la immunotinció d'Iba-1, en canvi, es va incubar les mostres amb l'anticòs secundari d'ase anti-conill AlexaFluor 594 (Invitrogen; #Ref

A32754; #Lot: UI290268) a concentració 1:400. Un cop s'ha acabat la tinció per immunohistoquímica, les mostres es col·loquen sobre portaobjectes gelatinats, es deixen assecar durant un mínim de 30 minuts i es fa el muntatge amb un medi aquós anomenat Flouromount (Sigma;#Ref: 1003103750; #Lot: SLCG4936)

Es van adquirir superimatges de 10µm excitades amb un làser díode de 561nm amb un temps d'exposició de 345ms. El raig de llum es va acoblar a una fibra multimodal que travessa la unitat Andor Borealis transformant el raig de llum amb un perfil gaussià en una superfície plana homogènia. Des d'aquí, es va passar a través d'un pinhole disc de 40µm. Les imatges es van adquirir utilitzant una càmera científica semiconductora d'òxid metàl·lic complementari (sCMOS) d'alta resolució (Zyla 4.2, 2.0 Andor, Oxford Instruments Company) i el software Fusion (Andor, Oxford Instruments Company). L'anàlisi es va realitzar utilitzant el software d'accés públic ImageJ/Fiji.

6. ESTADÍSTICA

Els resultats es mostren en forma de mitjana \pm desviació estàndard (DE). L'anàlisi estadístic s'ha realitzat amb el software Graphpad 6.0. Es van utilitzar el test two-way ANOVA, l'anàlisi per t-Student per múltiples comparacions i la prova One-way ANOVA.

Els resultats s'obtenen a partir de l'anàlisi de les diferents regions d'interès (ROIs) a cada hemisferi. Per exemple, en les imatges de MRI s'analitza l'hipocamp dels dos hemisferis perquè el model animal d'hipoperfusió que s'ha utilitzat és asimètric. La asimetria d'aquest model podria causar alteracions diferents entre hemisferis. En estat basal aquest anàlisi per hemisferis es manté de manera que l'anàlisi dels resultats inclou mesures del cervell sencer o no. Per una banda, els resultats de l'anàlisi de les imatges d'angiografia TOF són úniques per cada artèria. D'altra banda, els resultats d'altres modalitats d'imatge s'han analitzat per separat en hemisferis amb la finalitat de comparar les dades de cada hemisferi des de l'estat basal fins 2 mesos després de la inducció d'hipoperfusió amb ACAS. Quan aquests resultats en estat basal no han mostrat diferències significatives entre hemisferis s'han agrupat com ara en les imatges de perfusió ASL, en les de l'estudi de la densitat microvascular tant *in vivo* a partir dels mapes Q com *ex vivo* a partir d'imatges de microscòpia confocal, en les imatges de DTI *in vivo* i *ex vivo* i per immunohistoquímica d'alteracions de la substància blanca i, per últim, els resultats del gruix cortical.

RESULTATS

1. ENVELLIMENT EN RATOLINS C57BL6

1.1.ALTERACIONS VASCULARS

1.1.1. Alteracions en la macrovasculatura

L'envelliment comporta canvis en la composició dels diferents elements que formen la paret dels vasos, cosa que podria provocar canvis estructurals en les principals artèries que irriguen el cervell com ara, l'artèria basilar (AB) i les artèries caròtides internes dreta (ACId) i esquerra (ACIe).

Es van analitzar diferents paràmetres de la morfologia arterial, com ara la longitud i la tortuositat a partir de les imatges d'angiografia per MRI obtingudes de ratolins C57Bl6 de les diferents edats d'estudi. Els resultats numèrics es troben recollits a la Taula 1 pel que fa a la longitud i a la Taula 2 per la tortuositat, indicant-se l'edat dels ratolins, la longitud i la tortuositat mitjana de cada artèria i la desviació estàndard de cada grup.

Taula 1. Resultats de les mesures de longitud en mm de les principals artèries que irriguen el cervell.

Soca	Edat	Artèries	Mitjana	DE
C57Bl6	6 mesos	AB	4.54	0.33
		ACId	5.73	1.35
		ACIe	5.54	0.81
	12 mesos	AB	4.76	0.26
		ACId	5.72	0.78
		ACIe	5.56	0.43
	18 mesos	AB	4.80	0.39
		ACId	5.92	0.30
		ACIe	5.88	0.41

Taula 2. Resultats de les mesures de tortuositat de les principals artèries que irriguen el cervell.

Soca	Edat	Artèria caròtida	Mitjana	DE
C57Bl6	6 mesos	Dreta	1.06	0.04
		Esquerra	1.06	0.02
	12 mesos	Dreta	1.08	0.07
		Esquerra	1.07	0.08
	18 mesos	Dreta	1.05	0.02
		Esquerra	1.06	0.02

L'anàlisi de resultats no va mostrar diferències significatives en la longitud de les diferents artèries entre les tres edats analitzades, tal com es mostra a la Figura 59A. De la mateixa manera, no es van trobar diferències significatives en la tortuositat de les artèries caròtides internes entre les tres edats analitzades, tal com es mostra a la Figura 59B.

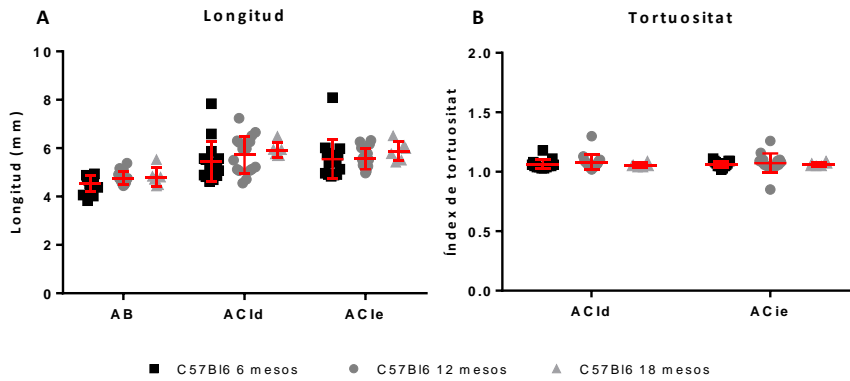


Figura 59. Efecte de l'envelliment sobre les principals artèries que irriguen el cervell: artèria basilar (AB), artèria caròtida interna dreta (ACId) i artèria caròtida interna esquerra (ACIe) en ratolins C57Bl6. **A)** Efecte de l'envelliment sobre la longitud de les principals artèries que irriguen el cervell. **B)** Efecte de l'envelliment sobre la tortuositat de les artèries caròtides internes. Resultats mostrats en mitjana \pm DE i avaluats amb el test Two-way ANOVA, amb post hoc Bonferroni. Es van utilitzar 15 animals C57Bl6 de 6 mesos, 16 animals C57Bl6 de 12 mesos i 6 animals C57Bl6 de 18 mesos.

En les mateixes sessions de MRI es van adquirir seqüències de perfusió (ASL) per estudiar l'efectivitat de la irrigació del cervell i els possibles canvis que es poden produir amb l'envelliment. El flux sanguini cerebral relatiu (rCBF) dels animals C57Bl6 va ser 163.22 ± 93.45 en animals de 6 mesos, 141.17 ± 52.09 en ratolins de 12 mesos, i 215.77 ± 34.73 en els de 18 mesos, expressat com a mitjana \pm desviació estàndard. L'anàlisi del rCBF dels diferents grups no va mostrar diferències significatives entre les diferents edats estudiades. La Figura 60 mostra els valors de rCBF dels ratolins C57Bl6 de les diferents edats d'estudi. Cada hemisferi va ser analitzat per separat i en no trobar-se diferències significatives, es van mostrar dos valors per cada animal.

Efecte de l'envelliment el flux sanguini cerebral

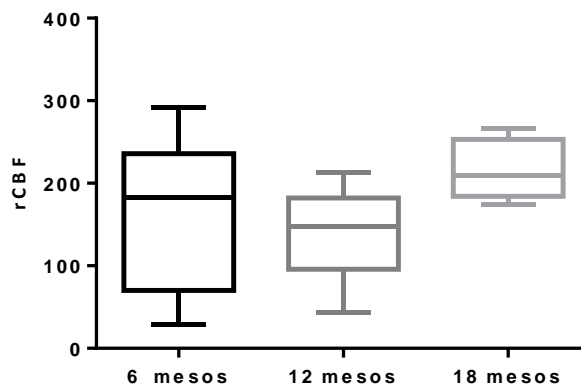


Figura 60. Efecte de l'envelliment sobre el flux sanguini cerebral en ratolins C57Bl6. Resultats mostrats en mitjana \pm DE i avaluats amb el test One-way ANOVA, post hoc Bonferroni. Els resultats es mostren per duplicat, sent el nombre de valors per animals C57Bl6 de 6 mesos (n=30), C57Bl6 de 12 mesos (n=32) i C57Bl6 de 18 mesos (n=12).

1.1.2. Alteracions en la microvasculatura

Tal i com s'ha esmentat en la introducció, l'envelliment provoca una reducció de la densitat de la microvasculatura, que pot produir una alteració de la perfusió cerebral, alterant l'intercanvi de gasos, així, generant un ambient hipòxic en el parènquima.

Es va analitzar la densitat microvascular en ratolins C57Bl6 de les diferents edats d'estudi *in vivo* i *ex vivo*, utilitzant dos mètodes diferents. Per una banda, es va avaluar la densitat microvascular *in vivo* mitjançant l'índex Q, que es va extreure a partir de la combinació dels mapes amb pes T2 de MRI. D'altra banda, la densitat microvascular (%) també es va mesurar *ex vivo* a partir d'imatges d'alta resolució obtingudes per microscòpia confocal. Els canvis en la densitat microvascular es van estudiar en les mateixes regions cerebrals que són l'escorça, l'estriat, l'hipocamp i el tàlem, emprant els dos mètodes.

A la Figura 61 es mostren els resultats de l'anàlisi de l'índex Q. Es va trobar una reducció significativa de la densitat microvascular *in vivo* al tàlem en animals de 18 mesos ($p=0.0299$), tal i com es mostra a la Figura 61D. Tanmateix es van trobar reduccions d'aquest paràmetre entre els ratolins de 12 mesos i els de 18 mesos al tàlem ($p=0.0255$) i a l'estriat ($p=0.0094$). No obstant, no es van trobar diferències significatives en la densitat microvascular a l'escorça (Figura 61A) ni a l'hipocamp (Figura 61B). Cada hemisferi va ser analitzat per separat i, en no trobar-se diferències estadísticament significatives, es van incloure dos valors per cada animal.

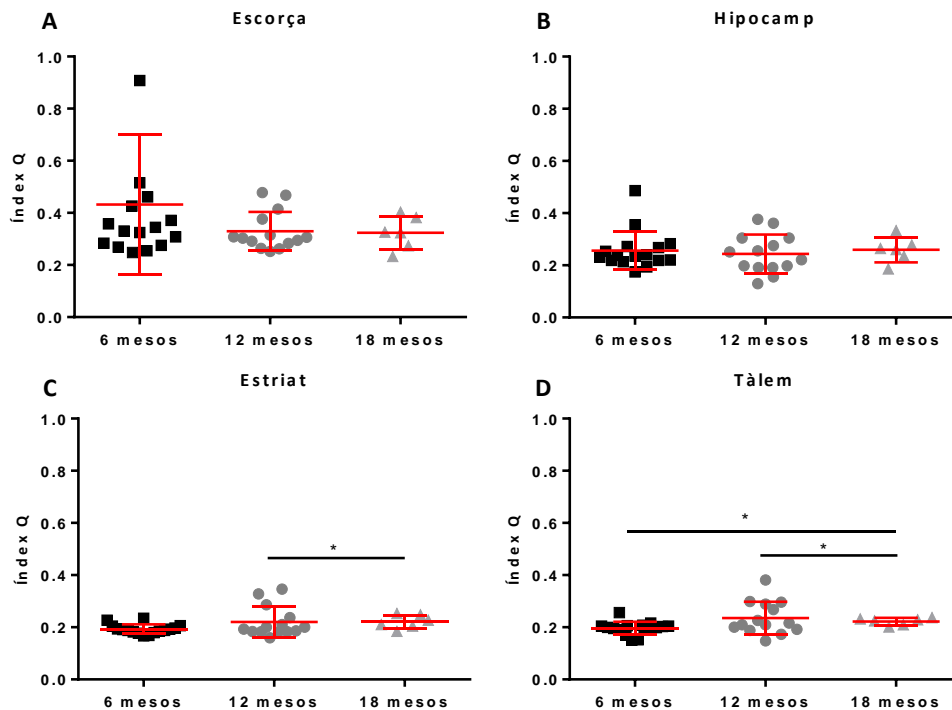


Figura 61. Efecte de l'envelliment sobre la microvasculatura *in vivo* utilitzant l'índex Q. **A)** Índex Q a l'escorça. **B)** Índex Q a l'hipocamp. **C)** Índex Q a l'estriat. **D)** Índex Q al tàlem. Resultats expressats com mitjana \pm DE i analitzats amb la prova T per múltiples comparacions. Els resultats estan per duplicat per hemisferis: C57Bl6 de 6 mesos (n=12), de 12 mesos (n=14) i de 18 mesos (n=6).

Es van estudiar les mateixes regions cerebrals *ex vivo* en imatges d'alta resolució per microscòpia amb la finalitat de validar les dades obtingudes *in vivo*. A la Figura 62 es mostren els resultats de l'anàlisi de la densitat microvascular *ex vivo*. A diferència de l'estudi *in vivo*, es va trobar una reducció significativa d'aquest paràmetre en animals de 18 mesos en totes les estructures estudiades.

Tal i com s'indica a la Figura 62A, la densitat microvascular mesurada *ex vivo* es va reduir a l'escorça de forma significativa en animals de 18 mesos ($p=0.0297$). De la mateixa manera, es va reduir a l'estriat de forma significativa en animals de 18 mesos ($p=0.0415$), tal i com es mostra a la Figura 62B. A l'hipocamp i al tàlem la densitat microvascular mesurada *ex vivo* es redueix de forma significativa amb l'envelliment, tal i com es mostra a les Figures 62C i 62D, respectivament. No obstant, en aquestes regions s'observa un petit increment d'aquest paràmetre en animals de 12 mesos, que no arriba a ser estadísticament significatiu.

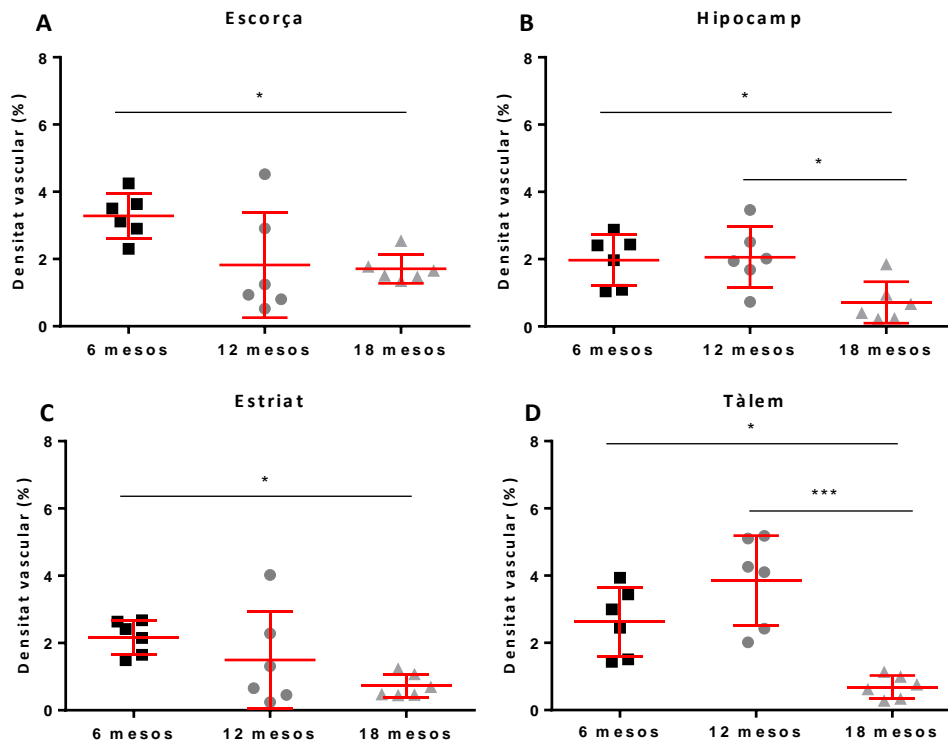


Figura 62. Efecte de l'envelliment sobre la densitat microvascular (%) mesurada *ex vivo* en ratolins C57Bl6. **A)** Densitat microvascular (%) a l'escorça. **B)** Densitat microvascular (%) a l'estriat. **C)** Densitat microvascular (%) a l'hipocamp. **D)** Densitat microvascular (%) al tàlem. Resultats expressats com mitjana \pm DE amb 3 animals per edat i analitzat amb One-way ANOVA amb post hoc anàlisi per Bonferroni.

1.2.ALTERACIONS DE LA SUBSTÀNCIA BLANCA

L'envelliment contribueix a deteriorar algunes funcions cerebrals com, per exemple, la memòria. La correcta activitat del cervell depèn del bon funcionament de les connexions cerebrals que permeten la comunicació entre les diferents estructures cerebrals a través de feixos d'axons recoberts de mielina.

Existeixen diferents tècniques que permeten estudiar alteracions en la mielina com ara, les imatges de DTI i el marcatge per immunohistoquímica de les proteïnes que componen la mielina com, per exemple, la proteïna bàsica de la mielina (MBP). Les imatges de DTI poden ser *in vivo* o *ex vivo*. Mentre que les imatges de DTI *in vivo* són més ràpides i de menor resolució, les imatges de DTI *ex vivo* poden trigar més temps en adquirir-se i, conseqüentment, tenir una major resolució. Aquestes últimes són especialment útils per detectar canvis en regions on hi ha menor quantitat de mielina

com ara, les estructures de substància grisa. No obstant, s'aprofunditzarà en l'estudi de les alteracions de la substància grisa al punt 1.3 d'aquest apartat.

En l'estudi de les alteracions a la substància blanca, cada hemisferi va ser analitzat per separat. Es van analitzar possibles diferències entre hemisferis i no es van trobar diferències estadísticament significatives. Per aquest motiu, totes les dades es troben per duplicat, és a dir, hi ha dos valors per cada animal.

1.2.1. Alteracions a les fibres de mielina *in vivo*

En les mateixes sessions de MRI on es va adquirir l'angiografia i la perfusió, es van adquirir seqüències de DTI *in vivo* per estudiar l'afectació dels axons i les cobertes de mielina amb l'edat. El fet d'aprofitar les mateixes sessions es va fer per reduir el nombre de vegades que cada animal havia de ser sotmès a anestèsia. Per contra, aquestes llargues sessions obligaven a optimitzar alguns paràmetres de l'adquisició com la resolució, per tal de limitar el temps d'exposició a aquesta.

Utilitzant aquestes seqüències es van estudiar un conjunt d'estructures tant de substància grisa com de substància blanca, tal i com es mostra a la Figura 63. Es van estudiar regions de substància grisa relacionades amb els processos cognitius com ara l'escorça, l'estriat o l'hipocamp. La quantitat de mielina que hi ha en aquestes estructures és reduïda, i, per aquest motiu, es dificulta la detecció de canvis. Per altra banda, es van estudiar les principals estructures de substància blanca que s'encarreguen de comunicar les diferents estructures cerebrals per permetre la seva activitat funcional com ara, el cos callós, la càpsula interna, la càpsula externa, la comissura anterior i la fímbria. La degeneració d'aquests feixos poden conduir a alterar les estructures que comuniquen.

ESTABLIMENT DE LES REGIONS D'INTERÉS (ROIS) EN IMATGES DE DTI

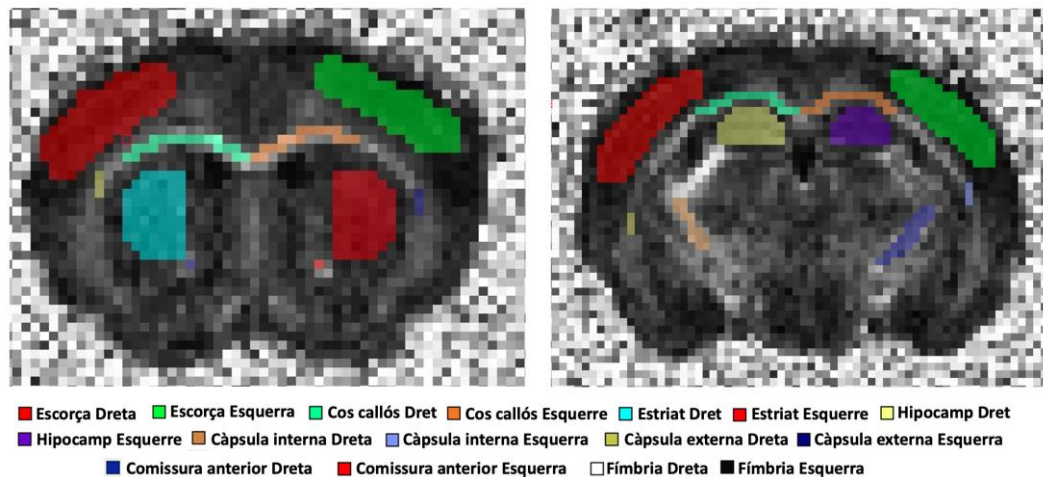


Figura 63. Esquema de l'anàlisi de les estructures d'interès (ROIs) que s'han estudiat sobre mapes d'anisotropia fraccionada (FA). Elaboració pròpia.

Es van extreure els diferents mètrics del DTI amb la finalitat de detectar l'origen de les alteracions de la substància blanca com ara, alteracions en la integritat de les fibres mitjançant l'anisotropia fraccionada (FA), alteracions en la estructuralitat de les fibres com la pèrdua de cèl·lules o l'increment de la necrosi mitjançant la difusió mitjana (MD), i alteracions en la direcció axial (AD) i ortogonal de la difusivitat (RD).

L'anàlisi del DTI *in vivo* basal va mostrar alteracions de la FA, indicant canvis en la integritat de les fibres degudes a l'envelliment en diferents estructures cerebrals. Aquestes alteracions es van detectar en estructures tant de substància grisa com de substància blanca, com ara, la càpsula externa (a l'edat de 12 mesos) o el cos callós (a l'edat de 18 mesos), tal i com es mostra a la Figura 64.

En canvi, l'envelliment en animals C57Bl6 no va produir canvis significatius en altres paràmetres de la imatge de DTI com ara, la difusió mitjana o la direccionalitat (figura 64B, 64C i 64D). En l'anàlisi *in vivo*, l'envelliment no va mostrar canvis fàcilment detectables. Fins i tot es van detectar subtils increments de la FA en regions com ara, l'estriat o l'hipocamp en animals C57Bl6 de 18 mesos (figura 64A).

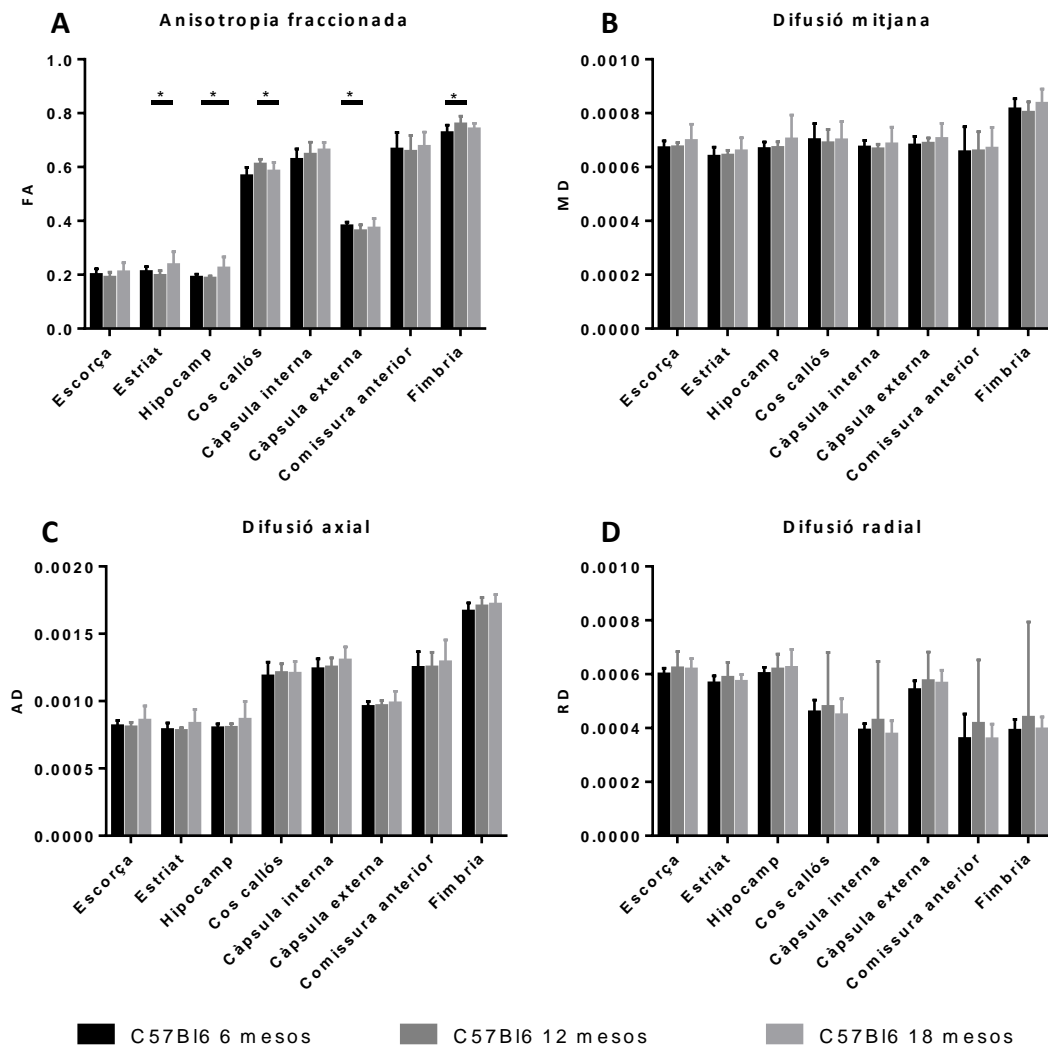


Figura 64. Estudi de les alteracions en la substància blanca *in vivo* en ratolins C57Bl6. **A)** Canvis en l'índex FA atribuïbles a l'envelliment. **B)** Canvis en l'índex MD atribuïbles a l'envelliment. **C)** Canvis en l'índex AD atribuïbles a l'envelliment. **D)** Canvis en l'índex RD atribuïbles a l'envelliment. Resultats expressats en mitjana ± DE i analitzats utilitzant la prova T per múltiples comparacions on * s'associa a una $p < 0.05$. Es van utilitzar ratolins C57Bl6 de 6 mesos ($n=30$), de 12 mesos ($n=32$) i de 18 mesos ($n=12$).

Un exemple d'estructura de substància blanca on es van trobar diferències significatives associades a l'envelliment va ser la càpsula externa (Figura 65A). Es va trobar una reducció de la FA en ratolins de 12 mesos a la càpsula externa ($p=0.0118$). La càpsula externa és un conjunt de fibres d'associació cortico-corticals que transcorren entre nuclis de la base com el nucli putamen i el claustre.

Una altra estructura de substància blanca on es van trobar diferències significatives associades a l'envelliment va ser el cos callós (Figura 65B). Es va detectar un increment de la FA en ratolins C57Bl6 de 12 mesos ($p < 0.0001$) i una reducció significativa al cos callós en ratolins de 18 mesos ($p=0.0263$) respecte els animals C57Bl6 de 12 mesos. El

cos callós és la estructura de fibres commissurals més ampla i gran del cervell. Connecta les diferents regions entre hemisferis amb la finalitat de coordinar les funcions d'ambdós.

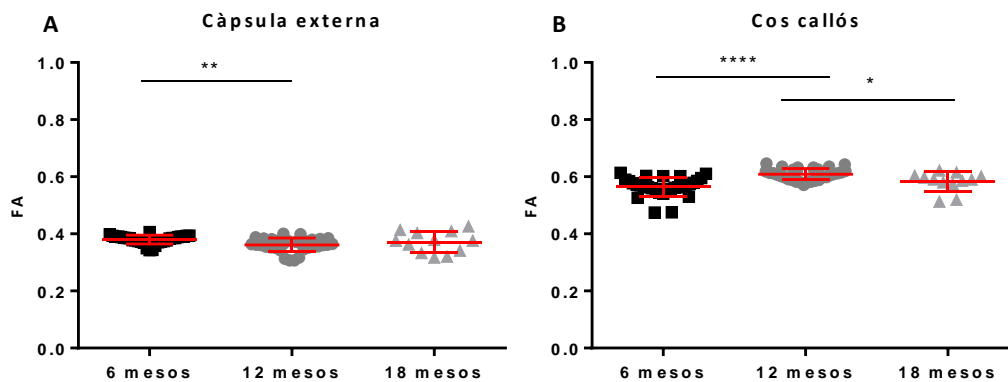


Figura 65. Alteracions en l'anisotropia fraccionada amb l'envelliment en ratolins C57Bl6. **A)** Índex FA a la càpsula externa. **B)** Índex FA al cos callós. Resultats expressats en mitjana \pm DE i analitzats per One-way ANOVA on * s'associa a una $p < 0.05$, ** a $p < 0.01$ i **** a $p < 0.0001$. Tamany de la mostra: C57Bl6 de 6 mesos ($n=30$), C57Bl6 de 12 mesos ($n=32$) i C57Bl6 de 18 mesos ($n=12$).

1.2.2. Alteracions a les fibres de mielina ex vivo

Tal i com s'ha esmentat a l'inici d'aquest apartat, la reduïda quantitat de fibres en regions com l'escorça, l'estriat o l'hipocamp, dificulta la detecció de subtils canvis en la mielina. La MRI és una tècnica multimodal, de manera que en una mateixa sessió, es poden incloure diferents seqüències per estudiar diferents alteracions patològiques i reduir, així el nombre de sessions que es sotmeten els animals a l'anestèsia. Aquest fet també permet reduir el nombre d'animals de l'estudi. Les seqüències de MRI *in vivo* tenen com a limitació el temps d'adquisició de forma que s'intenta reduir-lo preservant el màxim de resolució. Per detectar canvis patològics més subtils a la substància blanca, s'ha utilitzat una seqüència de DTI *ex vivo* que té major resolució.

Tal i com s'observa a la Figura 66, l'estudi de les alteracions de la substància blanca mitjançant la seqüència de DTI *ex vivo* d'alta resolució va permetre detectar alteracions que no eren detectables amb seqüències de menor resolució *in vivo*. L'anàlisi dels resultats de DTI *ex vivo* corroboren que l'envelliment, per si sol, no produeix grans alteracions en les fibres de mielina. L'anàlisi dels resultats de DTI *in vivo* mostraven

alteracions en la FA però no en la resta de components del DTI. En canvi, amb imatges de DTI *ex vivo* d'alta resolució, es van detectar reduccions en altres mètrics com la difusió mitjana i la difusió radial que apareixen a partir dels 12 mesos d'edat, tal i com es mostra a les Figures 66B i 66D, respectivament. No obstant, no es van detectar alteracions en la FA (Figura 66A).

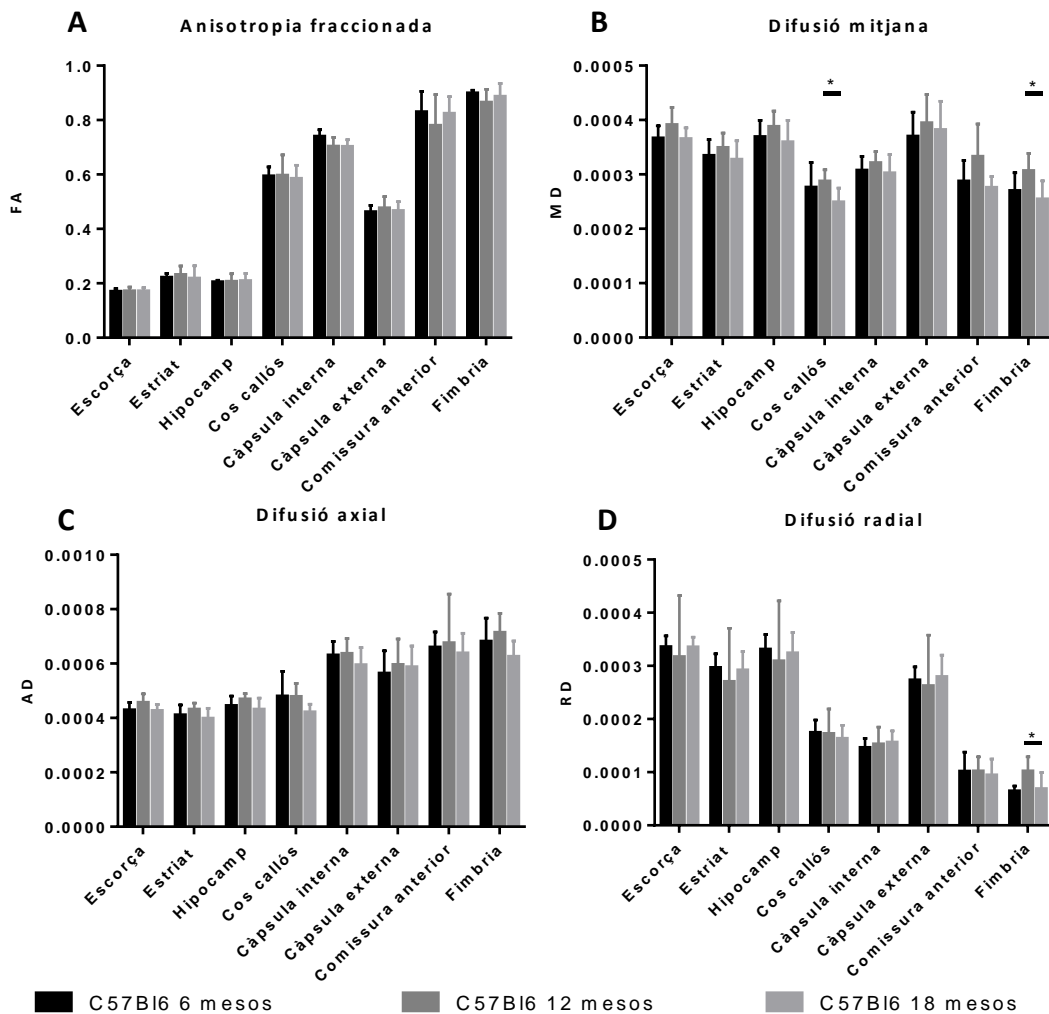


Figura 66. Alteracions en la substància blanca *ex vivo*. **A)** Efecte de l'envelliment sobre l'anisotropia fraccionada de les fibres, utilitzant l'índex FA. **B)** Efecte de l'envelliment sobre la difusivitat mitjana de les fibres, fent servir l'índex MD. **C)** Efecte de l'envelliment sobre la difusió axial de les fibres, utilitzant l'índex AD. **D)** Efecte de l'envelliment sobre la difusió ortogonal de les fibres, utilitzant l'índex RD. Resultats expressats com en mitjana \pm DE i analitzats utilitzant una prova T múltiple on * s'associa a una $p < 0.05$. El tamany de la mostra és novament per duplicats: (n=8) C57Bl/6 de 6 mesos, (n=14) C57Bl/6 de 12 mesos i (n=6) C57Bl/6 de 18 mesos.

Les alteracions en la difusió de l'aigua detectables per DTI són biomarcadors per imatge relativament recents. Per aquest motiu, les mesures de DTI tant *in vivo* com *ex*

vivo, es van validar amb immunotincions per MBP, que s'utilitza de forma freqüent per detectar alteracions en la mielina.

Per aprofitar tots els cervells al màxim, es van agafar dues seccions de 2mm de gruix de cada cervell per fer la clarificació, i es va reservar una secció intermèdia d'aproximadament 1mm per fer l'anàlisi histopatològic amb diferents marcadors, entre ells la MBP. Per aquest motiu no es va disposar de marcatge immunohistoquímic de totes les ROIs estudiades per DTI, tan sols de les regions intermèdies (escorça, cos callós, estriat i fimbria).

Tal i com s'observa a la Figura 67, es van avaluar canvis en la expressió de la proteïna MBP per immunohistoquímica. L'anàlisi dels resultats d'aquest experiment van posar de manifest una reducció de la expressió de MBP amb l'edat en totes les estructures analitzades ($p < 0.0001$). A la Figura 67B, es mostren exemples d'imatges de tinció immunohistoquímica per MBP representatives per cada edat d'estudi en animals C57Bl6.

Tal i com s'indica a la Figura 67A, es va trobar una reducció significativa de la expressió de MBP a l'escorça, al cos callós, a l'estriat i a la fimbria en ratolins de 18 mesos ($p < 0.001$) respecte els animals de 6 mesos. Aquesta reducció es va iniciar en tots els casos en ratolins de 12 mesos ($p < 0.0001$).

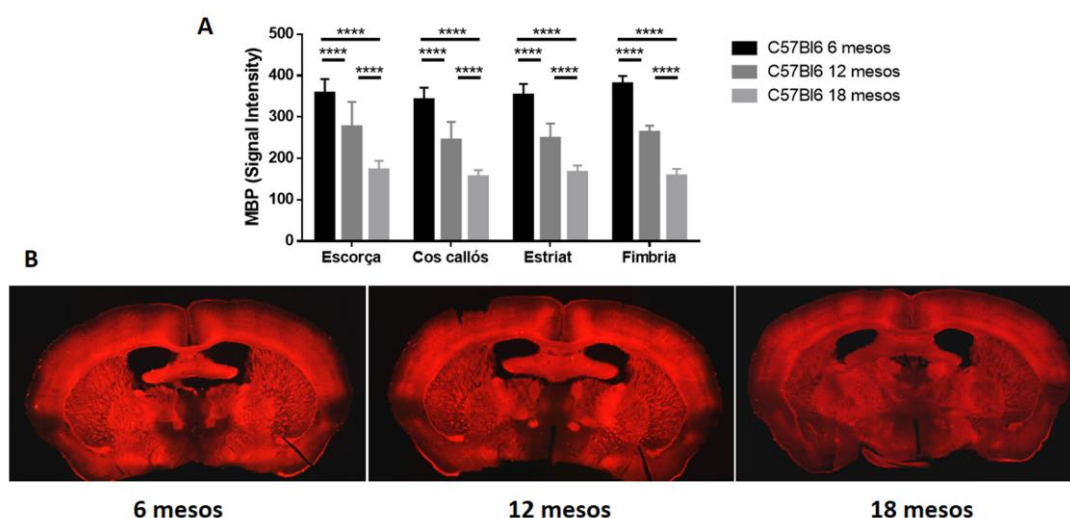


Figura 67. Alteracions en l'expressió de MBP amb l'envelliment a l'escorça, el cos callós, l'estriat i la fimbria en ratolins C57Bl6. **A)** Resultats expressats com en mitjana \pm DE i analitzats utilitzant Two-way ANOVA on **** s'atribueix a una $p < 0.0001$. **B)** Imatges representatives de les tincions d'immunohistoquímica, posant èmfasi al cos callós. El tamany de la mostra és novament per duplicats C57Bl6 de 6 mesos ($n=4$), C57Bl6 de 12 mesos ($n=4$) i C57Bl6 de 18 mesos ($n=6$).

1.3.ALTERACIONS A LA SUBSTÀNCIA GRISA

A part, d'haver estudiat canvis en la substància grisa per DTI, es van estudiar les alteracions pròpies de la substància grisa. A l'apartat anterior s'han estudiat alteracions en les fibres d'estructures com l'escorça, l'estriat o l'hipocamp, tal i com s'indica a la Figura 63. En aquest apartat es mostren les dades que es van obtenir a partir de l'estudi del gruix cortical.

Amb l'envelliment normal hi ha una pèrdua de neurones i connexions sinàptiques, que produeix un encongiment de les capes de l'escorça, donant lloc a atrofia cortical. Els patrons d'atròfia cerebral s'associen a canvis funcionals i són diferents entre patologies, de forma que podrien utilitzar-se com a biomarcadors diagnòstics.

Es van utilitzar els mapes amb pes T2 adquirits en les sessions de MRI per avaluar canvis en el gruix cortical. El gruix cortical es mesura de forma rutinària en clínica on s'utilitzen eines estandarditzades automàtiques com les eines de morfometria basada en vòxels (VBM). Malauradament, aquest tipus d'eines no estan estandarditzades en recerca amb models animals, i la majoria de laboratoris es dissenyen les seves eines d'anàlisi.

El gruix cortical (mm) dels ratolins C57Bl6 va ser 0.99 ± 0.04 en el grup de 6 mesos, 0.99 ± 0.02 en el grup de 12 mesos, i 0.96 ± 0.03 en el grup de 18 mesos, expressat com a mitjana \pm desviació estàndard.

Tal i com s'observa en la Figura 68, el gruix cortical es redueix significativament amb l'edat en animals C57Bl6. Mentre que els ratolins de 18 mesos tenen un menor gruix cortical respecte els animals de 6 mesos ($p=0.00017$) i els animals de 12 mesos ($p=0.0107$), no s'han detectat diferències significatives en el gruix cortical dels animals de 12 mesos respecte els de 6 mesos ($p=0.8033$).

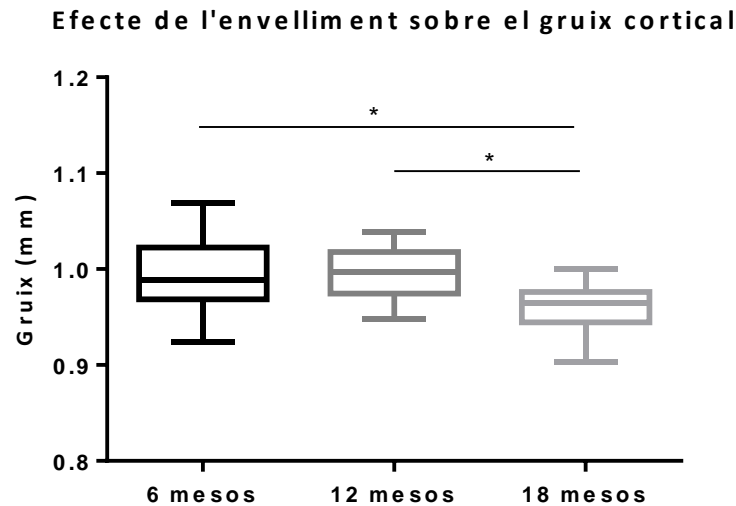


Figura 68. Efecte de l'envelliment sobre el gruix cortical. Resultats expressats en mitjana \pm DE i s'han analitzat utilitzant la prova One-way ANOVA on * s'associa a una $p < 0.05$. Per l'anàlisi del gruix cortical, els valors estan per duplicat per hemisferis: C57Bl6 de 6 mesos ($n=30$), C57Bl6 de 12 mesos ($n=32$) i C57Bl6 de 18 mesos ($n=12$).

1.4.ALTERACIONS EN LA CONDUCTA

Les alteracions en la conducta poden aparèixer com a conseqüència dels canvis vasculars que es produeixen amb envelliment, factors de risc o amb la presència de patologies cròniques. Tal i com s'ha explicat en la introducció, els tests d'avaluació neuropsicològica segueixen sent una de les eines més útils per al diagnòstic de demència. Els tests de conducta són les eines que permeten extreure la màxima informació neurològica en models animals. En aquests cas s'han avaluat canvis de caire motor en la coordinació i la força muscular i la capacitat exploratòria.

L'anàlisi dels resultats va mostrar una reducció significativa ($p=0.0003$) en la força muscular entre les tres edats analitzades, indicant debilitat muscular amb l'envelliment, tal i com es mostra a la Figura 69B. Es va analitzar la capacitat exploratòria general utilitzant dos paràmetres diferents però relacionats com són la distància recorreguda i la velocitat i es va detectar una reducció significativa de la distància recorreguda ($p=0.0071$) i de la velocitat ($p=0.0109$), indicant una reducció de la capacitat exploratòria amb l'edat (Figures 69C i 69D, respectivament). L'anàlisi de possibles alteracions en la coordinació motora no va mostrar diferències estadísticament significatives ($p=0.1141$), tal i com s'observa a la Figura 69A.

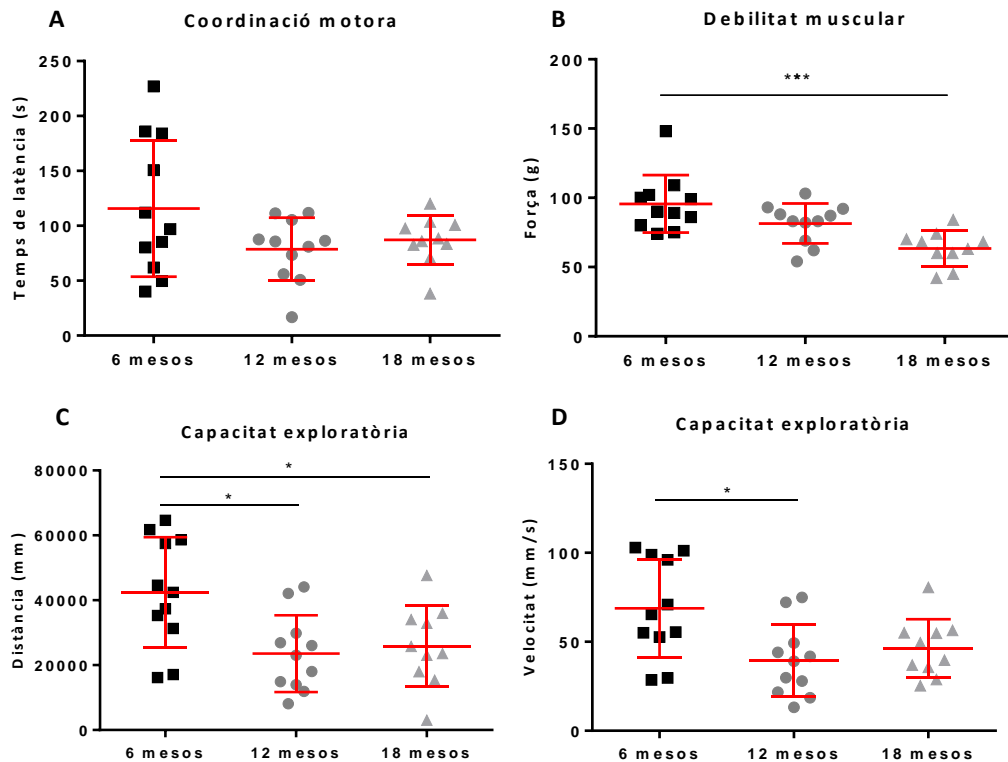


Figura 69. Alteracions en la conducta amb l’envelliment. **A)** Efecte de l’envelliment sobre la coordinació motora. **B)** Efecte de l’envelliment sobre la força motora. Efecte de l’envelliment sobre la capacitat exploratòria (**C**) i (**D**). Resultats expressats en mitjana \pm DE i s’han analitzat utilitzant la prova One-way ANOVA on * s’associa a una $p < 0.05$. S’han utilitzat animals C57Bl/6 de 6 mesos ($n=11$), animals C57Bl/6 de 12 mesos ($n=11$) i animals C57Bl/6 de 18 mesos ($n=10$).

L’avaluació neuropsicològica en persones amb demència és molt important, tant per al diagnòstic com per a la detecció precoç de la malaltia. Els tests de conducta que es van utilitzar en aquest estudi també van permetre mesurar canvis de caire més cognitiu, com per exemple canvis en la memòria a curt termini i ansietat. Els canvis de memòria a curt termini es van avaluar mitjançant el test de reconeixement de nous objectes. Aquest test es va realitzar a partir dels 7 dies després de la cirurgia. Per aquest motiu, no hi ha dades basals de memòria a curt termini.

A la Figura 70 es mostren els resultats de l’anàlisi de l’ansietat en relació a l’envelliment. L’instint d’autoprotecció dels rosegadors els fa evitar els espais oberts. Es va mesurar el temps relatiu en % que passaven a la part més interior de la caixa del camp obert (regió interior) i el que passaven al costat de les vores de la caixa (regió exterior). El temps que els animals passen a la regió exterior és major que el que passen a la part interna a totes les edats ($p < 0.0001$). No obstant, el percentatge de temps que passen en cada regió no canvia amb l’edat en animals C57Bl/6 ($p=0.2006$).

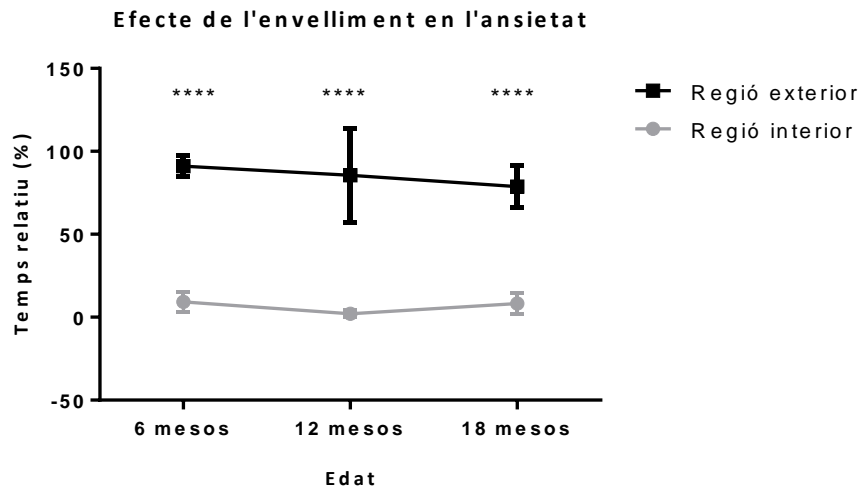


Figura 70. Alteracions en l'ansietat amb l'edat en animals C57Bl6. Resultats expressats en mitjana \pm DE i s'han analitzat utilitzant la prova Two-way ANOVA on *** a una $p < 0.0001$. S'han utilitzat animals C57Bl6 6 de mesos ($n=11$), animals C57Bl6 de 12 mesos ($n=11$) i animals C57Bl6 de 18 mesos ($n=10$).

2. ENVELLIMENT EN RATOLINS APOE^{-/-} I COMPARATIVA AMB ELS C57BL6

La deficiència de l'apolipoproteïna E s'associa a hipercolesterolèmia i hiperlipèmia que, al seu torn, condueixen a aterosclerosi. S'ha descrit que les alteracions vasculars originades per l'aterosclerosi poden esdevenir en demència amb l'edat. Els ratolins ApoE^{-/-} són un model animal d'aterosclerosi per la implicació d'aquesta proteïna en el transport de colesterol. La seva deficiència incrementa el colesterol en sang, augmentant el risc de formació de plaques d'ateroma, que s'associen a un major risc d'oclusió dels vasos, especialment a les bifurcacions arterials.

Per la implicació d'aquesta proteïna en les alteracions vasculars en l'envelliment i les seves funcions sobre la correcta funció cerebral es creu que pot contribuir al dany cerebral que precipita al desenvolupament de demència. Per aquest motiu, la comparativa entre ratolins C57BL6 i ratolins ApoE^{-/-} pot ser útil en l'estudi dels factors desencadenats de demència i contribuir així a la detecció precoç d'aquesta mitjançant biomarcadors de neuroimatge.

Es van estudiar els canvis en la macrovasculatura i en la microvasculatura comparant animals ApoE^{-/-} i els seus corresponents animals control C57BL6 a les tres edats d'estudi. El fet d'afegir també les tres edats d'estudi permet estudiar al mateix temps l'efecte de l'envelliment i de l'aterosclerosi sobre la vasculatura cerebral i les conseqüències que pot tenir la combinació d'aquests factors en el desenvolupament de demència. Mentre que l'envelliment és un factor de risc no modificable sobre el que no es pot intervenir terapèuticament, l'aterosclerosi es pot prevenir amb diferents intervencions farmacològiques com ara, amb estatines.

2.1.ALTERACIONS VASCULARS

2.1.1. Alteracions en la macrovasculatura

Es van analitzar diferents paràmetres de la estructura arterial, com ara, la longitud i la tortuositat a partir de les imatges d'angiografia TOF obtingudes de ratolins ApoE^{-/-} de les diferents edats d'estudi. Els resultats numèrics es troben recollits en la Taula 3 pel que fa a la longitud i en la Taula 4 per la tortuositat, indicant-se l'edat dels ratolins, la mitjana i la desviació estàndard de cada grup.

Taula 3. Resultats de les mesures de longitud en mm de les principals artèries que irriguen el cervell.

Soca	Edat	Artèries	Mitjana	DE
ApoE	6 mesos	AB	4.29	0.31
		ACId	5.16	0.62
		ACIe	4.90	0.73
	12 mesos	AB	4.45	0.50
		ACId	5.13	0.50
		ACIe	5.01	1.17
	18 mesos	AB	4.72	0.29
		ACId	5.14	0.54
		ACIe	5.18	0.42

Taula 4. Resultats de les mesures de tortuositat de les principals artèries que irriguen el cervell.

Soca	Edat	Artèria caròtida	Mitjana	DE
ApoE	6 mesos	Dreta	1.12	0.09
		Esquerra	1.11	0.09
	12 mesos	Dreta	1.13	0.11
		Esquerra	1.21	0.22
	18 mesos	Dreta	1.18	0.08
		Esquerra	1.14	0.04

L'anàlisi de resultats de les imatges d'angiografia TOF va mostrar un increment significatiu de la longitud de l'artèria basilar (AB) en ratolins ApoE^{-/-} de 18 mesos, però no va permetre detectar diferències significatives en la longitud de les artèries caròtides internes, tal com es mostra a la Figura 71A. Tampoc no es van trobar diferències significatives en la tortuositat de les artèries caròtides internes entre les tres edats analitzades, tal com es mostra a la Figura 71B.

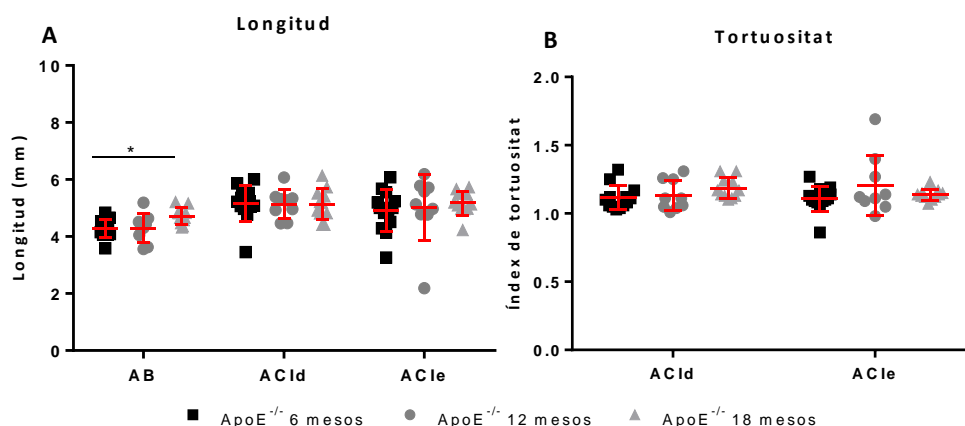


Figura 71. Efecte de l'envelliment sobre les principals artèries que irriguen els cervell: artèria basilar (AB), artèria caròtida interna dreta (ACId) i artèria caròtida interna esquerra (ACIe) en ratolins ApoE^{-/-}. **A)** Efecte de l'envelliment sobre la longitud de les principals artèries que irriguen el cervell. **B)** Efecte de l'envelliment sobre la tortuositat de les artèries caròtides internes. Resultats mostrats en mitjana ± DE i avaluats amb la prova T per múltiples comparacions. Es van utilitzar 13 animals ApoE^{-/-} de 6 mesos, 9 animals ApoE^{-/-} de 12 mesos i 11 animals ApoE^{-/-} de 18 mesos.

Es van comparar ratolins C57Bl6 i ratolins ApoE^{-/-} a les diferents edats d'estudi en els diferents paràmetres de morfologia arterial.

La longitud de l'artèria basilar (AB) dels animals ApoE^{-/-} va ser 4.29 ± 0.31 en els ratolins de 6 mesos, 4.45 ± 0.50 en els de 12 mesos, i 4.72 ± 0.29 en els de 18 mesos, expressat com a mitjana \pm desviació estàndard. En animals C57Bl6 va ser 4.54 ± 0.33 en els ratolins de 6 mesos, 4.76 ± 0.26 en els de 12 mesos, i 4.80 ± 0.39 en els de 18 mesos, expressat com a mitjana \pm desviació estàndard.

Els valors de la longitud de l'artèria caròtida interna dreta (ACId) expressats com a mitjana \pm desviació estàndard dels animals ApoE^{-/-} va ser 5.16 ± 0.62 en els ratolins de 6 mesos, 5.13 ± 0.50 en els de 12 mesos, i 5.14 ± 0.54 en els de 18 mesos, expressat com a mitjana \pm desviació estàndard. En canvi, en animals C57Bl6 va ser 5.73 ± 1.35 en els ratolins de 6 mesos, 5.72 ± 0.78 en els de 12 mesos, i 5.92 ± 0.30 en els de 18 mesos.

La longitud de l'artèria caròtida interna esquerra (ACIe) dels animals ApoE^{-/-} va ser 4.90 ± 0.73 en els ratolins de 6 mesos, 5.01 ± 1.17 en els de 12 mesos, i 5.18 ± 0.42 en els de 18 mesos, expressat com a mitjana \pm desviació estàndard. En canvi, els valors de la longitud de l'ACIe en ratolins C57Bl6 de 6 mesos va ser de 5.54 ± 0.81 , en els de 12 mesos va ser de 5.56 ± 0.43 , i 5.88 ± 0.41 en els de 18 mesos, expressat com a mitjana \pm desviació estàndard.

L'anàlisi de les dades de longitud es troben representades a la Figura 72. El resultat de l'anàlisi de les dades de longitud de les principals artèries que irriguen el cervell no va mostrar canvis significatius en la longitud de les diferents artèries entre les tres edats analitzades, excepte en el cas de l'AB. Es va trobar una reducció de la longitud d'aquesta artèria en animals ApoE^{-/-} de 12 mesos ($p=0.0045$), tal i com es mostra a la Figura 72A .

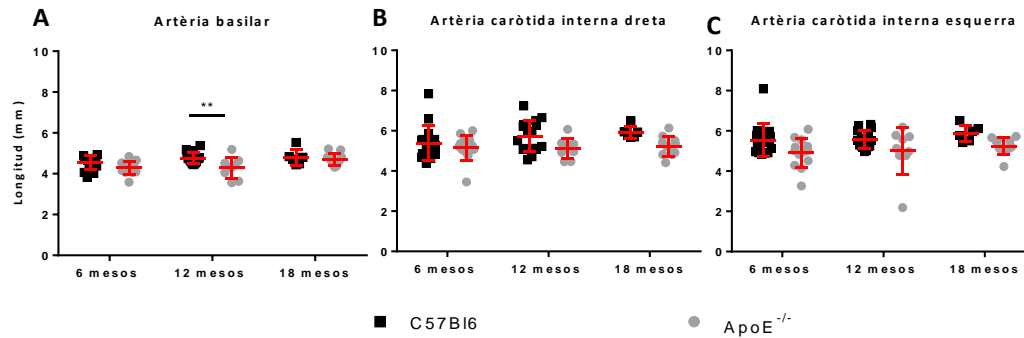


Figura 72. Efecte de l'aterosclerosi sobre la longitud de les principals artèries que irriguen el cervell. **A)** Efecte de l'aterosclerosi sobre la longitud de l'artèria basilar. **B)** Efecte de l'aterosclerosi sobre la longitud de l'artèria caròtida interna dreta. **C)** Efecte de l'aterosclerosi sobre la longitud de l'artèria caròtida interna esquerra. Resultats expressats en mitjana \pm DE i analitzats amb Two-way ANOVA on ** s'associa a $p < 0.01$. Es van utilitzar ratolins C57Bl6 de 6 mesos ($n=15$), de 12 mesos ($n=16$) i de 18 mesos ($n=6$) i ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos ($n=13$), 12 mesos ($n=9$) i 18 mesos ($n=11$).

Es van mesurar també canvis de tortuositat en les artèries caròtides internes, mitjançant l'índex de tortuositat. Els valors d'aquest índex per l'ACId expressats com a mitjana \pm desviació estàndard en ratolins ApoE^{-/-} van ser 1.12 ± 0.09 en el grup de 6 mesos, 1.13 ± 0.11 en els de 12 mesos, i 1.18 ± 0.08 en els de 18 mesos, expressat com a mitjana \pm desviació estàndard. En ratolins C57Bl6, va ser 1.06 ± 0.04 en els ratolins de 6 mesos, 1.08 ± 0.07 en els de 12 mesos, i 1.05 ± 0.02 en els de 18 mesos.

L'índex de tortuositat de l'ACIe dels ratolins ApoE^{-/-} va ser 1.11 ± 0.09 en el grup de 6 mesos, 1.21 ± 0.22 en els de 12 mesos, i 1.14 ± 0.04 en els de 18 mesos, expressat com a mitjana \pm desviació estàndard. En canvi, en animals C57Bl6 va ser 1.06 ± 0.02 en el grup de 6 mesos, 1.07 ± 0.08 en els de 12 mesos, i 1.06 ± 0.02 en els de 18 mesos, expressat com a mitjana \pm desviació estàndard.

A la Figura 73 es mostren les dades de l'anàlisi de l'índex de tortuositat. Els resultats de l'anàlisi de les dades de tortuositat de les artèries caròtides internes no van mostrar diferències significatives en ratolins de 6 mesos (Figura 73A). La longitud de l'ACId ($p=0.0808$) i de l'ACIe ($p=0.1744$) no van mostrar canvis a edats joves, indicant que les alteracions produïdes per l'aterosclerosi es donen amb l'envelliment. En canvi, es va trobar un augment progressiu de la tortuositat amb l'envelliment. Tal i com es mostra a la Figura 73B, es va produir un augment de la tortuositat de l'ACIe en ratolins ApoE^{-/-} de 12 mesos ($p=0.0195$), que no es va trobar a l'ACId ($p=0.5288$). Amb l'envelliment, en canvi, es va produir un increment de la tortuositat simètric ja que en animals de 18 mesos es va trobar un augment de l'índex de tortuositat en les dues

artèries caròtides internes dreta ($p < 0.001$) i esquerra ($p = 0.0137$) en ratolins ApoE^{-/-} respecte ratolins C57Bl6, tal i com es mostra a la Figura 73C.

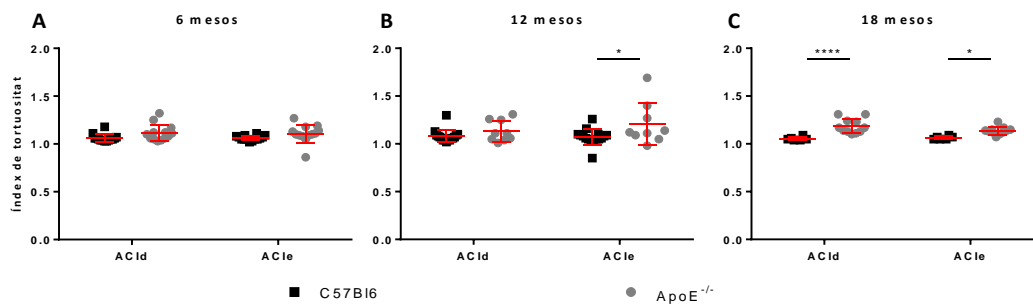


Figura 73. Efecte de l'aterosclerosi sobre la tortuositat de les artèries caròtides internes. **A)** En ratolins de 6 mesos. **B)** En ratolins de 12 mesos. **C)** En animals de 18 mesos. Resultats expressats en mitjana \pm DE i analitzats amb Two-way ANOVA. S'han utilitzat animals C57Bl6 de 6 mesos ($n=15$), 12 mesos ($n=16$) i 18 mesos ($n=6$) i animals ApoE^{-/-} de 6 mesos ($n=13$), 12 mesos ($n=9$) i 18 mesos ($n=11$) on * significa una $p < 0.05$ i **** s'associa a una $p < 0.001$.

La deficiència d'ApoE s'associa a major incidència d'aterosclerosi amb l'edat, produint canvis sobre la vasculatura, que poden influir en la perfusió cerebral. Per estudiar els possibles canvis en la perfusió cerebral que es poden produir amb l'aterosclerosi a les diferents edats d'estudi, es van adquirir imatges de perfusió ASL.

El flux sanguini cerebral relatiu (rCBF) dels ratolins ApoE^{-/-} va ser 140.37 ± 63.42 en el grup de 6 mesos, 82.08 ± 56.93 en el de 12 mesos, i 129.34 ± 61.06 en el de 18 mesos, expressat com a mitjana \pm desviació estàndard.

La Figura 74 mostra els valors de rCBF dels ratolins ApoE^{-/-} de 6, 12 i 18 mesos d'edat. L'anàlisi del rCBF dels diferents grups va mostrar una reducció significativa entre els animals de 6 mesos i els de 12 mesos ($p = 0.0082$), que no es manté en ratolins de 18 mesos. Cada hemisferi va ser analitzat per separat sense mostrar diferències significatives, per la qual cosa hi ha dos valors per cada animal.

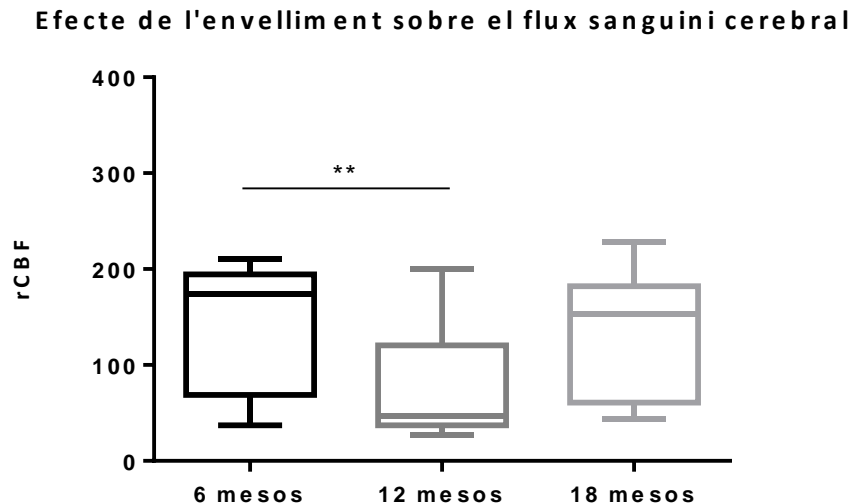


Figura 74. Efecte de l'envelliment sobre el flux sanguini cerebral en ratolins ApoE^{-/-}. Resultats mostrats en mitjana \pm DE i avaluats amb el test One-way ANOVA, post hoc Bonferroni on ** equival a una $p < 0.001$. Els valors que es van incloure van ser 26 en ApoE^{-/-} de 6 mesos, 18 per ratolins ApoE^{-/-} de 12 mesos i 22 pel grup d'ApoE^{-/-} de 18 mesos.

Es van comparar les dades obtingudes a partir de seqüències de perfusió (ASL) per estudiar canvis en l'efectivitat de la irrigació del cervell associats a la combinació de l'envelliment i l'aterosclerosi.

Els valors del flux sanguini cerebral relatiu (rCBF) expressats com a mitjana \pm desviació estàndard en ratolins C57Bl6 va ser 163.22 ± 93.45 en el grup de 6 mesos, 141.17 ± 52.09 en els de 12 mesos, i 215.77 ± 34.73 en els de 18 mesos. En els ratolins ApoE^{-/-} va ser 140.37 ± 63.42 en el grup de 6 mesos, 82.08 ± 56.93 en els de 12 mesos, i 129.34 ± 61.06 en els de 18 mesos.

La Figura 75 mostra els valors de rCBF dels ratolins C57Bl6 en comparació als ApoE^{-/-} de 6, 12 i 18 mesos d'edat. Cada hemisferi va ser analitzat per separat, per la qual cosa hi ha dos valors per cada animal. L'anàlisi del rCBF en el grup d'animals de 6 mesos no va mostrar diferències significatives ($p=0.6034$). En canvi, amb l'edat es va produir una reducció del flux sanguini que es pot associar a l'aterosclerosi ja que els resultats de l'anàlisi van mostrar una reducció del rCBF en ratolins ApoE^{-/-} de 12 ($p=0.0090$) i 18 mesos ($p=0.0003$) respecte ratolins C57Bl6 de 12 i de 18 mesos, tal i com es mostra a la Figura 75A. A la Figura 75B es mostren imatges representatives dels mapes de rCBF de les dues soques en les tres edats d'estudi.

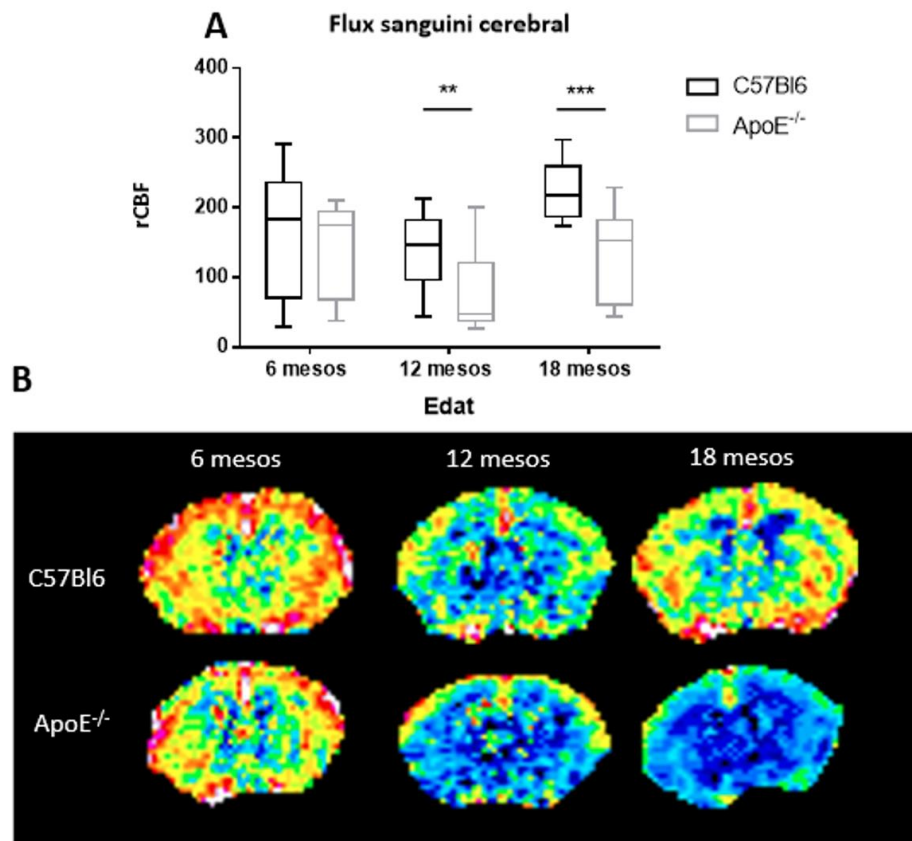


Figura 75. Efecte de l'aterosclerosi en combinació amb l'envelliment sobre el flux sanguini cerebral. **A)** Canvis en el flux sanguini cerebral produïts per l'aterosclerosi amb l'edat. Resultats expressats en mitjana \pm DE i analitzats amb Two-way ANOVA on ** s'associa a $p < 0.01$ i *** a $p < 0.001$. Els resultats es mostren per duplicat en les dues soques: animals C57Bl6 de 6 mesos ($n=30$), 12 mesos ($n=32$) i 18 mesos ($n=12$) i animals ApoE^{-/-} de 6 mesos ($n=26$), 12 mesos ($n=18$) i 18 mesos ($n=22$). **B)** Imatges de perfusió ASL representatives per soca i edat.

2.1.2. Alteracions en la microvasculatura

L'apolipoproteïna E té múltiples funcions en el correcte funcionament del cervell i sobre la vasculatura, tal i com s'ha esmentat en la introducció. Per aquest motiu, és esperable que la manca d'expressió d'aquesta accentuï les alteracions vasculares que es donen amb l'envelliment. La deficiència de ApoE està relacionada amb depòsits de partícules de colesterol a les parets vasculares, formant les plaques d'ateroma. Aquests depòsits afecten al lliure moviment de la sang, incrementant el risc d'oclusió dels vasos i produint hipoperfusió. La formació de plaques d'ateroma a les parets vasculares, a més, dificulta l'intercanvi de gasos. Els efectes de la deficiència d'aquesta proteïna sobre la vasculatura en sinergia amb els efectes de l'envelliment, poden influir sobre la densitat de la microvasculatura.

Es va analitzar la densitat microvascular *in vivo* i *ex vivo* en ratolins ApoE^{-/-} de les diferents edats d'estudi, utilitzant dos mètodes diferents i en les mateixes regions cerebrals. Es van incloure dos valors de cada animal, un per cada hemisferi cerebral, donat que no hi havia diferències significatives entre ells.

Per una banda, es van estudiar els canvis en la densitat microvascular *in vivo* utilitzant l'índex Q. L'anàlisi dels resultats va mostrar una reducció significativa de la densitat microvascular a l'escorça (p=0.0397) i a l'estriat (p=0.0077) en els ApoE^{-/-} de 18 mesos, tal i com es mostra a les Figures 76A i 76C, respectivament. A la Figura 76B, es mostra una reducció significativa de la densitat microvascular a l'hipocamp en animals de 18 mesos respecte ratolins de 6 mesos (p=0.0079) i de 12 mesos (p=0.0416). L'hipocamp és una estructura cerebral relacionada amb la formació i consolidació de la memòria. Finalment, també es va detectar un augment de la densitat microvascular (p<0.0001) al tàlem (Figura 76D), indicant que els 12 mesos d'edat no és una edat suficientment avançada per detectar alteracions en la microvasculatura al tàlem.

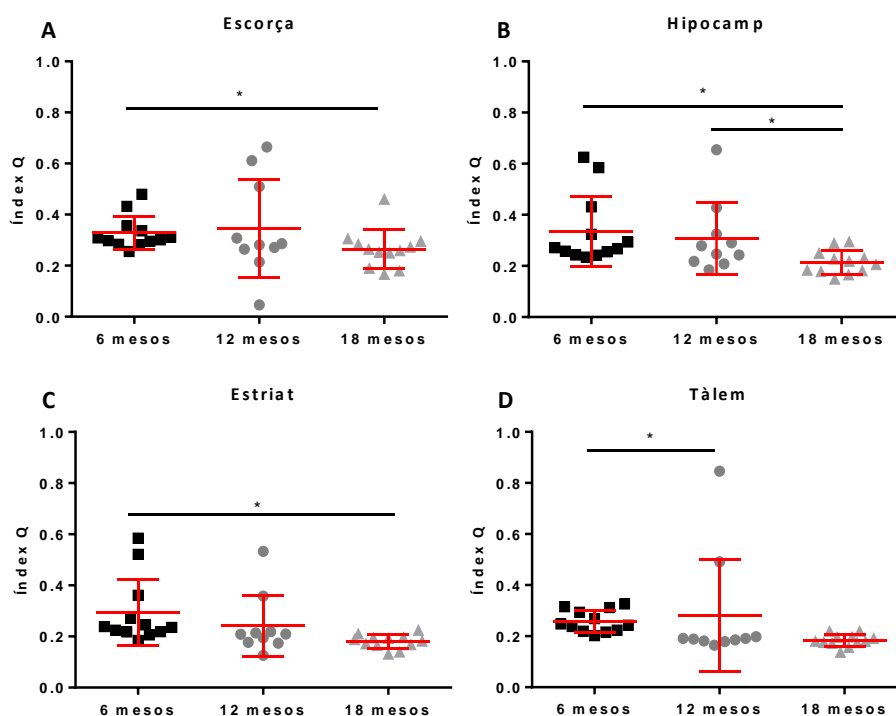


Figura 76. Efecte de l'envelliment sobre la microvasculatura *in vivo* en ratolins ApoE^{-/-}. **A)** Canvis en la microvasculatura a l'escorça. **B)** Canvis en la microvasculatura a l'hipocamp. **C)** Canvis en la microvasculatura a l'estriat. **D)** Canvis en la microvasculatura al tàlem. Resultats expressats com mitjana ± DE. Dades analitzades emprant One-way ANOVA amb post hoc anàlisi per Bonferroni on * equival a una p<0.05. Els resultats estan per duplicat per

hemisferis de manera que el tamany de la mostra és: ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=12), de 12 mesos (n=10) i de 18 mesos (n=12).

Es va analitzar la densitat microvascular comparant ratolins C57Bl6 i ApoE^{-/-} de les diferents edats d'estudi *in vivo* i *ex vivo*, utilitzant els dos mètodes explicats anteriorment.

L'anàlisi de les dades de la densitat microvascular *in vivo* està representat a la Figura 77. El resultat de l'anàlisi de les dades no va mostrar diferències significatives en l'índex Q entre les tres edats analitzades en cap de les regions estudiades que es puguin atribuir a l'aterosclerosi.

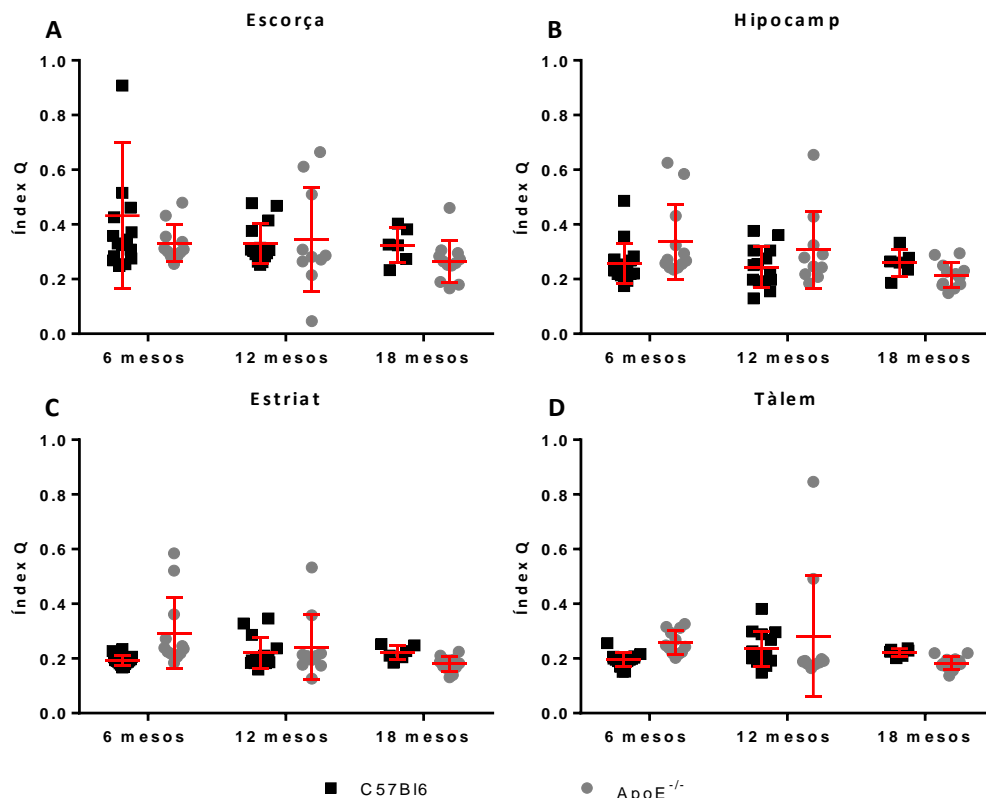


Figura 77. Efecte de l'aterosclerosi sobre la densitat microvascular in vivo. **A)** Canvis en la densitat microvascular a l'escorça. **B)** Canvis en la densitat microvascular a l'hipocamp. **C)** Canvis en la densitat microvascular a l'estriat. **D)** Canvis en la densitat microvascular al tàlem. Resultats expressats en mitjana ± DE i analitzats amb Two-way ANOVA. S'han utilitzat animals C57Bl6 de 6 mesos (n=15), 12 mesos (n=16) i 18 mesos (n=6) i animals ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=13), 12 mesos (n=9) i 18 mesos (n=11).

Posteriorment al sacrifici dels ratolins, es van estudiar canvis en la densitat vascular *ex vivo* a partir d'imatges confocals d'alta resolució. Les dades d'aquest experiment es mostren a la Figura 78 en relació a l'efecte de l'envelliment en ratolins ApoE^{-/-}. Es van analitzar els canvis en la densitat vascular a l'escorça, l'estriat, l'hipocamp

i el tàlem per hemisferis i no es van trobar diferències significatives. Per aquesta raó, hi ha dos valors per cada animal.

L'anàlisi de les dades va mostrar una reducció significativa de la densitat microvascular amb l'edat a l'hipocamp ($p=0.009$) i al tàlem ($p=0.0477$). Tal i com s'indica a la Figura 78B, la reducció de la densitat vascular a l'hipocamp es va iniciar en ratolins de 12 mesos ($p=0.0003$). Tal i com s'indica a la Figura 78D, de la mateixa manera es va produir al tàlem ($p=0.0293$). No obstant, no es van detectar diferències significatives en la densitat vascular ni a l'escorça ($p=0.4898$) ni a l'estriat ($p=0.3301$) associades a l'envelliment en ratolins ApoE^{-/-}, tal i com es mostra a les Figures 78A i 78C.

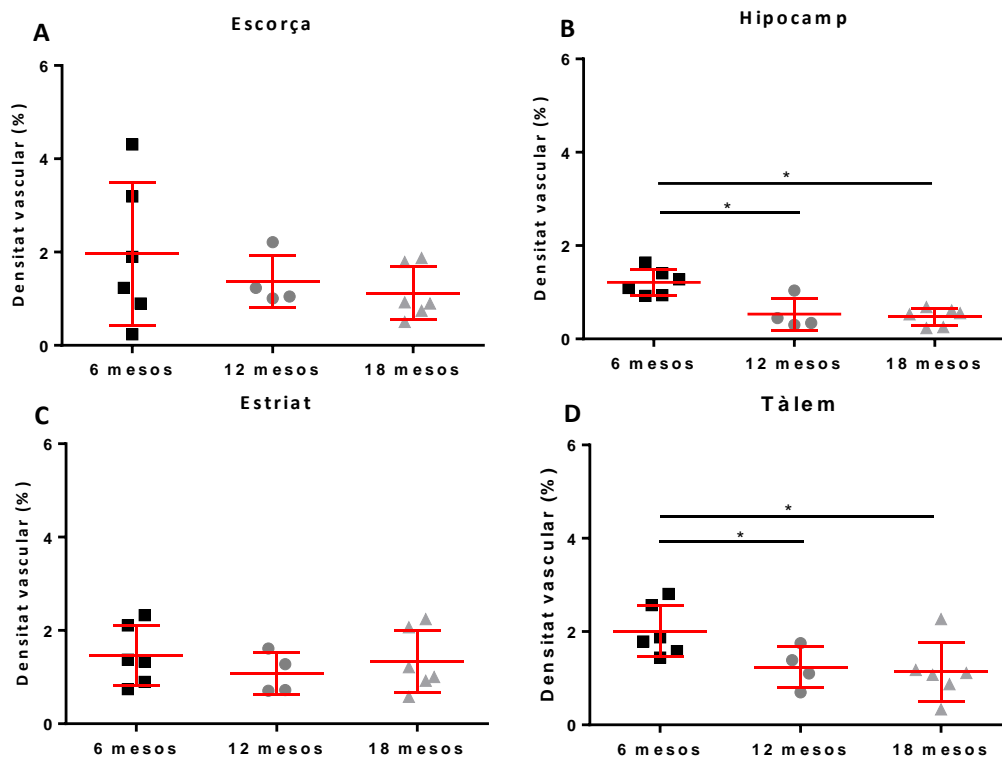


Figura 78. Efecte de l'envelliment sobre la vasculatura en animals ApoE^{-/-}. **A)** Canvis en la densitat vascular a l'escorça. **B)** Canvis en la densitat vascular a l'estriat. **C)** Canvis en la densitat vascular a l'hipocamp. **D)** Canvis en la densitat vascular al tàlem. Resultats expressats com mitjana ± DE. Anàlisi realitzat utilitzant una prova T múltiple on * s'associa a una $p < 0.05$. Els resultats estan per duplicat per hemisferis de manera que d'animals ApoE^{-/-} de 6 mesos ($n=6$), de 12 mesos ($n=4$) i de 18 mesos ($n=6$).

A diferència de l'estudi *in vivo* de la densitat microvascular, l'anàlisi de les dades *ex vivo* va mostrar una reducció significativa de la densitat microvascular associada a l'aterosclerosi a l'escorça ($p=0.0359$), a l'hipocamp ($p=0.003$) i al tàlem ($p=0.03$). No obstant, no es van detectar canvis atribuïbles a l'aterosclerosi a l'estriat ($p=0.5329$). Tal

i com s'observa a la figura 79A, l'anàlisi post hoc utilitzant Bonferroni no va mostrar diferències significatives. En canvi, l'anàlisi post hoc sí va mostrar diferències significatives atribuïbles a l'aterosclerosi en ratolins de 12 mesos a l'hipocamp (Figura 79B) i al tàlem (figura 79D). A l'hipocamp es va trobar una reducció de la densitat microvascular en ratolins ApoE^{-/-} de 12 mesos respecte els C57Bl6 de 12 mesos (p=0.0013). Es va trobar aquesta mateixa reducció significativa al tàlem (p=0.0001).

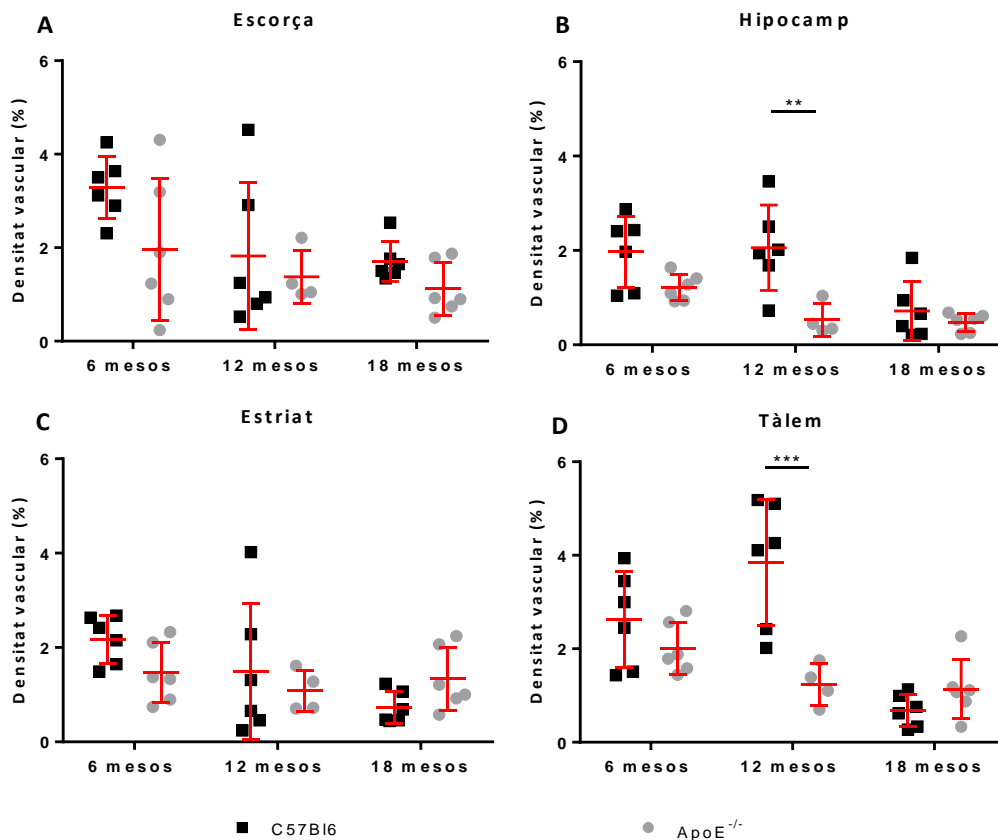


Figura 79. Efecte de l'aterosclerosi sobre la vasculatura en ratolins ApoE^{-/-}. **A)** Canvis en la densitat vascular a l'escorça. **B)** Canvis en la densitat vascular a l'estriat. **C)** Canvis en la densitat vascular a l'hipocamp. **D)** Canvis en la densitat vascular al tàlem. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats mitjançant el test Two-way ANOVA, post hoc Bonferroni on ** equival a una p<0.01 i *** a p<0.001.

2.2.ALTERACIONS A LA SUBSTÀNCIA BLANCA

ApoE està implicada en el transport de colesterol, que és un dels principals components de la mielina. La deficiència d'aquesta proteïna i les alteracions vasculars que es donen en l'envelliment, poden produir alteracions en les fibres mielíniques que afectaran a la connexió entre les diferents regions cerebrals. Com s'ha esmentat anteriorment, es van estudiar les alteracions de la mielina utilitzant imatges de DTI *in vivo* i *ex vivo* i immunotincions per MBP.

Com s'ha explicat en l'apartat anterior, les dades de DTI es van analitzar per hemisferis. L'anàlisi de les dades per hemisferis en estat basal no va mostrar diferències significatives. Per aquest motiu, es mostren dos valors per cada animal.

2.2.1. Alteracions a les fibres de mielina *in vivo*

Es van adquirir imatges de DTI *in vivo* per l'estudi longitudinal dels canvis en la mielina en ratolins ApoE^{-/-}. L'anàlisi de les dades de les imatges de DTI en els ApoE^{-/-} de les tres edats d'estudi va mostrar alteracions en la FA, la DM i la direccionalitat (AD i RD) de les fibres, tal i com es mostra a la figura 80.

A diferència de l'efecte de l'envelliment en ratolins C57Bl6, les dades de DTI *in vivo* en ratolins ApoE^{-/-} van mostrar disminució de la FA a l'escorça ($p < 0.0001$), a l'estriat ($p = 0.0046$) i a l'hipocamp ($p = 0.00011$) en ratolins de 18 mesos, tal i com es mostra a la Figura 80A. No obstant, al cos callós i a la fímbria ($p < 0.0001$) es va trobar un augment de la FA als 18 mesos d'edat, indicant alteracions en la resposta inflamatòria. Es va detectar una reducció de la MD en diferents estructures cerebrals com l'hipocamp (0.0089), el cos callós ($p < 0.0001$), la càpsula interna ($p = 0.00015$) i a la fímbria ($p < 0.0001$), indicant alteracions en la estructuralitat de les fibres de mielina (Figura 80B). La difusió axial, que indica alteracions en l'axó, es va reduir amb l'envelliment en ratolins ApoE^{-/-} a l'escorça ($p = 0.0072$), a l'estriat ($p = 0.0108$), a l'hipocamp (0.0025), al cos callós ($p < 0.0001$), a la càpsula interna ($p = 0.00018$) i a la fímbria ($p = 0.0069$), tal i com s'observa a la Figura 80C. La difusió radial (RD) es va reduir en ratolins ApoE^{-/-} amb l'envelliment al cos callós ($p < 0.0001$) i a la fímbria ($p < 0.0001$), indicant menys mielinització (Figura 80D).

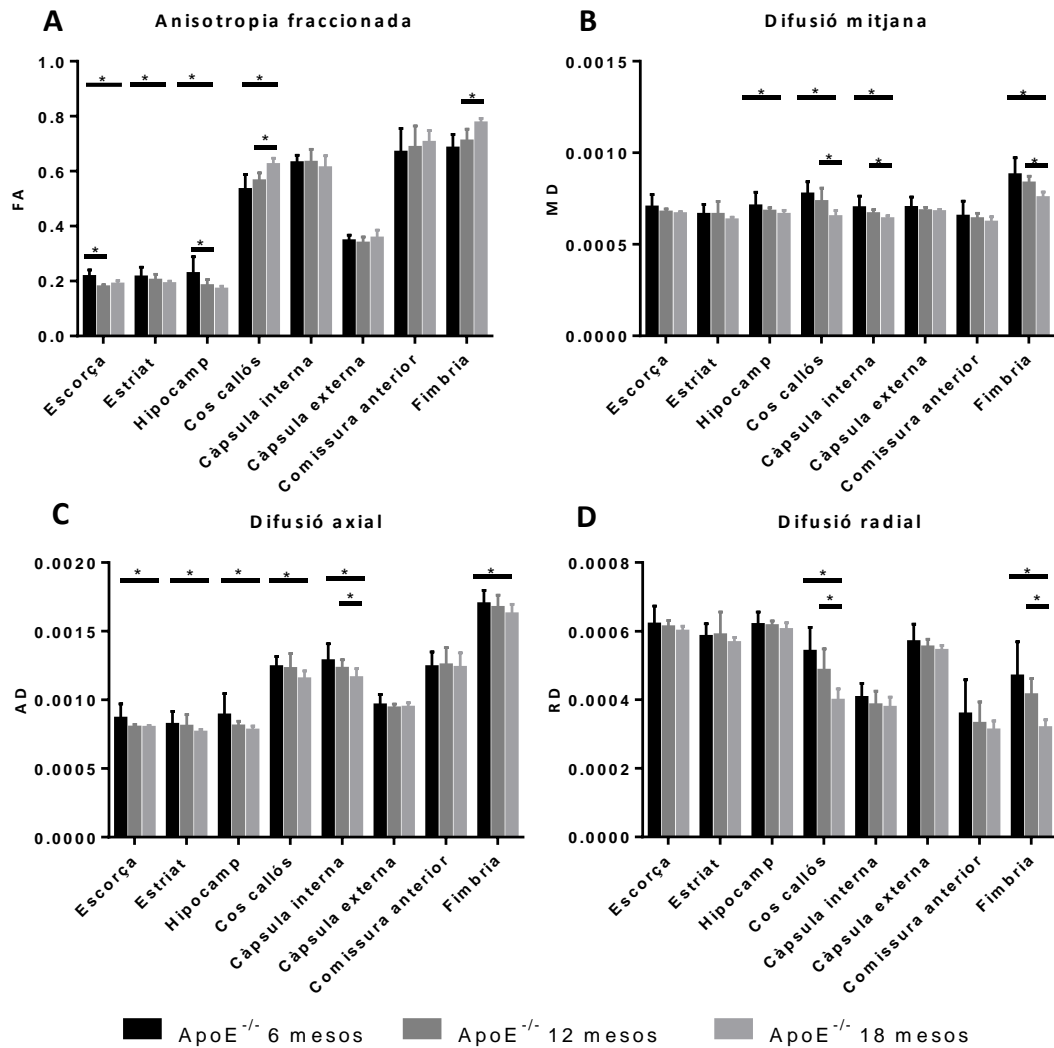


Figura 80. Estudi de les alteracions en la substància blanca in vivo en animals ApoE^{-/-}. **A)** Canvis en la integritat de les fibres, utilitzant l'índex FA. **B)** Estudi del canvis en la estructuralitat de les fibres mitjançant l'índex MD. **C)** Canvis en la difusió axial de les fibres, emprant l'índex AD. **D)** Estudi del canvis en la difusió ortogonal de les fibres mitjançant l'índex RD. Resultats expressats en mitjana ± DE i analitzats utilitzant una prova T múltiple on * s'associa a una p<0.05. Tamany de la mostra: (n=26) ApoE^{-/-} de 6 mesos, (n=18) ApoE^{-/-} de 12 mesos i (n=22) ApoE^{-/-} de 18 mesos.

Un exemple d'estructura que va presentar alteracions amb l'envelliment en ratolins ApoE^{-/-} va ser l'hipocamp. L'hipocamp va presentar ja una reducció de la FA en ratolins de 12 mesos (p=0.0030), que es mantenia als 18 mesos d'edat. A l'hipocamp, es va trobar una reducció de la MD (p=0.0081) i de la AD com l'AD (p=0.0015) en ratolins de 18 mesos. Malgrat la RD sembla que es redueix amb el temps, aquesta reducció no és significativa (p=0.1896). L'hipocamp és una estructura cerebral implicada en la formació i la consolidació de la memòria, la orientació espacial i l'atenció que s'ha vist afectada en altres tipus de demències.

L'anàlisi de les dades de les imatges de DTI *in vivo* comparant C57Bl6 i ApoE^{-/-} va permetre detectar alteracions en tots els components del DTI, tal i com s'observa a la Figura 81.

L'aterosclerosi va produir una reducció de la FA al cos callós ($p=0.0008$), a la càpsula externa ($p=0.0005$) i a la fimbria ($p<0.0001$) en ratolins de 6 mesos, indicant una pèrdua d'integritat de les fibres a edats joves (Figura 81A). En ratolins de 12 mesos, l'aterosclerosi va produir una reducció de la FA al cos callós ($p<0.0001$) i a la fimbria ($p=0.0001$), mantenint alteracions que apareixen en edats joves. En canvi, en ratolins de 18 mesos es va trobar una reducció de la FA a estructures pobres en mielina com l'estriat ($p=0.0006$) i l'hipocamp ($p<0.0001$) i en altres estructures riques en mielina com és la càpsula interna ($p=0.0002$).

En canvi, la MD es va trobar augmentada a l'escorça i a la fimbria en ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos a l'estriat i a la fimbria ($p<0.0001$), indicant un augment de l'edema en les fibres de mielina en edats joves a estructures relacionades amb la memòria (Figura 81C). No obstant, l'aterosclerosi va produir una reducció de la MD a la fimbria ($p<0.0001$) en ratolins de 18 mesos, indicant pèrdua cel·lular.

L'aterosclerosi no va produir alteracions en la difusió axial de les fibres de mielina fins edats avançades (Figura 81B) i, més concretament, a la càpsula interna ($p<0.0001$). El resultat de les imatges de DTI *in vivo* van mostrar que l'aterosclerosi va produir una reducció de la AD a la fimbria ($p<0.0001$) en ratolins ApoE^{-/-} de 18 mesos. En canvi, a edats joves la AD augmenta al cos callós ($p<0.0001$), indicant que l'aterosclerosi podria no produir danys en els axons fins edats avançades. L'aterosclerosi no va produir canvis en la RD, indicant que podria no estar implicada en el procés de mielinització (Figura 81D).

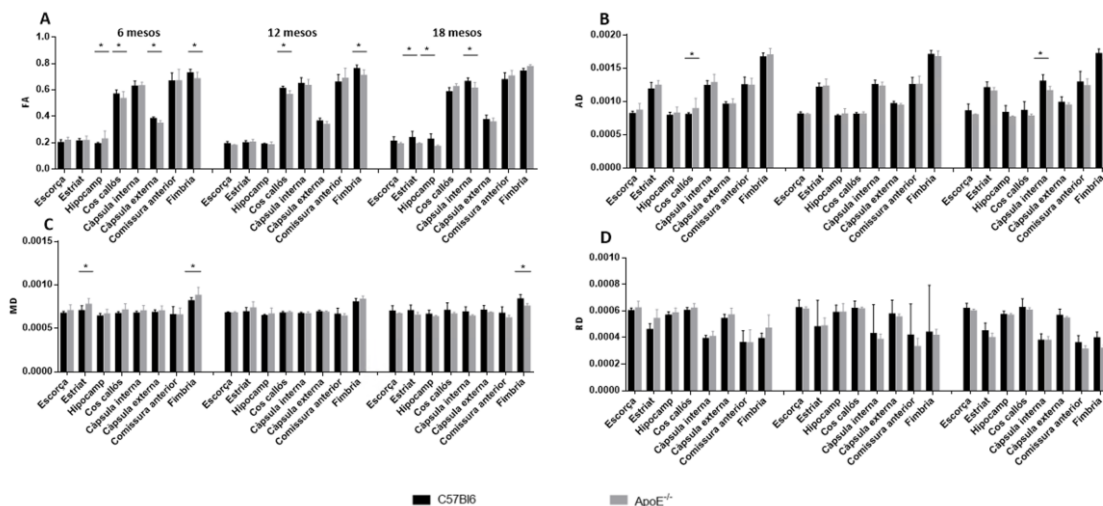


Figura 81. Efecte de l'aterosclerosi en les fibres de mielina *in vivo*. **A)** Canvis en l'anisotropia fraccionada de les fibres de mielina. **B)** Canvis en la difusió axial de les fibres de mielina. **C)** Canvis en la difusió mitjana. **D)** Canvis en la difusió ortogonal. Resultats expressats en mitjana \pm DE i analitzats amb a prova Two-way on * s'associa a $p < 0.05$. Els resultats es mostren per duplicat per hemisferis en les dues soques: animals C57Bl6 de 6 mesos (n=30), 12 mesos (n=32) i 18 mesos (n=12) i animals ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=26), 12 mesos (n=18) i 18 mesos (n=22).

2.2.2. Estudi d'alteracions a les fibres de mielina *ex vivo*

Les imatges de DTI *in vivo* tenen una resolució limitada en la detecció d'alteracions en les fibres de mielina d'estructures pobres en mielina com poden ser les regions de substància grisa. Aquesta limitació es pot superar amb imatges d'alta resolució *ex vivo*.

Segons s'observa a la Figura 82, els resultats de l'anàlisi de les dades dels diferents components del DTI *ex vivo* van permetre trobar alteracions estadísticament significatives de la FA, la MD i en la direccionalitat (AD i RD) entre les diferents edats estudiades en animals ApoE^{-/-}. Les dades de DTI *ex vivo* van validar que amb l'envelliment la deficiència d'apolipoproteïna E produeix alteracions en tots els mètrics de DTI. A diferència dels resultats *in vivo*, la FA només es va trobar una reducció a la càpsula interna ($p=0.0021$) tal i com es mostra a la Figura 82A. Aquests resultats indiquen que la deficiència d'apolipoproteïna E produeix alteracions en la integritat de les fibres de mielina amb l'envelliment prou significatives, de manera que ja es poden detectar amb seqüències de DTI de menor resolució (Figura 80A).

A diferència dels resultats de MD explicats en l'apartat *in vivo*, la MD va augmentar en ratolins ApoE^{-/-} de 18 mesos a l'escorça ($p=0.0006$), l'estriat ($p=0.0011$), l'hipocamp ($p=0.0027$), la càpsula externa ($p=0.0115$) i la fimbria ($p=0.00012$), tal i com s'observa a

la Figura 82B. A diferència dels resultats *in vivo*, es va detectar un augment de la AD a la fímbria ($p=0.0023$) així com un augment de la RD a l'hipocamp ($p=0.0045$) i a la càpsula interna ($p=0.0051$), tal i com es mostra a les Figures 82C i 82D. A més, també es va detectar un augment de la RD en ratolins de 18 mesos respecte els de 12 mesos a l'escorça ($p=0.0014$), a l'estriat ($p=0.0023$), a la càpsula interna ($p=0.0081$) i a la fímbria ($p=0.0032$), indicant que les alteracions de mielinització s'inicien als 12 mesos d'edat.

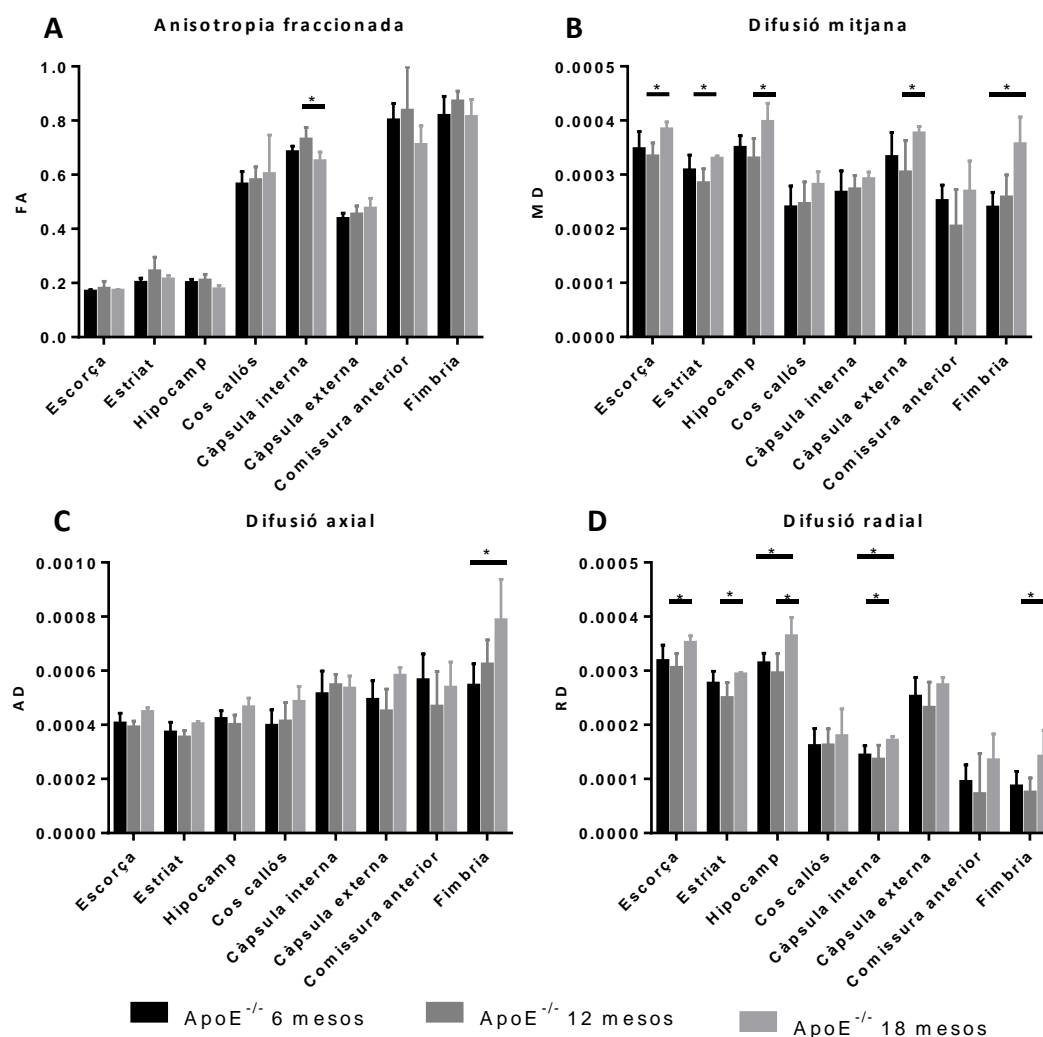


Figura 82. Alteracions en la substància blanca ex vivo. **A)** Efecte de l'envelliment sobre la integritat de les fibres, utilitzant l'índex FA. **B)** Efecte de l'envelliment sobre la estructuralitat de les fibres, fent servir l'índex MD. **C)** Efecte de l'envelliment sobre la difusió axial de les fibres, utilitzant l'índex AD. **D)** Efecte de l'envelliment sobre la difusió orthogonal de les fibres, utilitzant l'índex RD. Resultats expressats com en mitjana \pm DE i analitzats utilitzant una prova T múltiple on * s'associa a una $p < 0.05$. Tamany de la mostra: (n=8) ApoE^{-/-} de 6 mesos, (n=10) ApoE^{-/-} de 12 mesos i (n=6) ApoE^{-/-} de 18 mesos.

En l'anàlisi comparatiu entre soques es van trobar reduccions en la FA que permeten confirmar que l'aterosclerosi produeix canvis en la integritat de les fibres, especialment amb l'envelliment i a la comissura anterior (Figura 83A).

Mentre que les dades de DTI *in vivo* només van permetre detectar alteracions puntuals en la MD, les dades de DTI *ex vivo* van permetre identificar una reducció de la MD en ratolins ApoE^{-/-} de 12 mesos. Mentre que la MD es va reduir en aquest grup, en ratolins ApoE^{-/-} de 18 mesos la MD augmenta a la fímbria (p<0.0001), indicant la possibilitat de formació d'edema en edats avançades (Figura 83C). L'aterosclerosi va produir una reducció de la AD en ratolins ApoE^{-/-} de 6 i 12 mesos a la càpsula interna (p=0.0011) i a la fímbria (p=0.0002) en ratolins de 6 mesos, a diferència de l'estudi *in vivo*. No obstant, es va detectar un augment d'aquest paràmetre a la fímbria en ratolins de 18 mesos (Figura 83B). L'anàlisi de les dades de DTI *ex vivo* van confirmar que l'aterosclerosi no produeix canvis en la RD (Figura 83D), tot i observar-se un augment puntual d'aquesta a la comissura anterior en ratolins ApoE^{-/-} de 18 mesos.

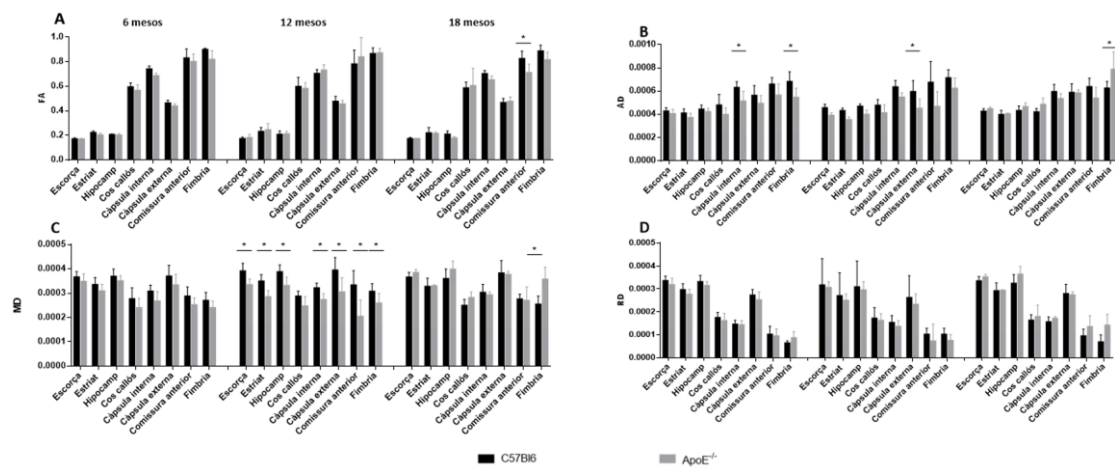


Figura 83. Efecte de l'aterosclerosi en les fibres de mielina *ex vivo*. **A)** Alteracions en les fibres en l'anisotropia fraccionada. **B)** Alteracions a la difusivitat mitjana. **C)** Alteracions en la difusió axial. **D)** Alteracions en la difusió ortogonal. Resultats expressats en mitjana \pm DE i analitzats amb Two-way ANOVA on * s'associa a p<0.05, ** a una p<0.01 i *** a p<0.001. Els resultats es mostren per duplicat per hemisferis en les dues soques: animals C57Bl6 de 6 mesos (n=30), 12 mesos (n=32) i 18 mesos (n=12) i animals ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=26), 12 mesos (n=18) i 18 mesos (n=22).

Amb l'objectiu de validar les dades del DTI *in vivo* i *ex vivo*, es van mesurar canvis en la expressió de MBP per immunohistoquímica. Es van analitzar les dades per hemisferis i no es van detectar diferències significatives, motiu pel qual hi ha dos valors per cada animal.

A la Figura 84A es recullen les dades de MBP en ratolins ApoE^{-/-}. L'anàlisi de les dades va mostrar una disminució de l'expressió de MBP en totes les regions estudiades en les diferents edats en animals ApoE^{-/-} ($p < 0.05$), a diferència de l'anàlisi de DTI, on es mostrava un comportament més heterogeni en funció de la regió i de l'edat analitzades. A la Figura 84B es mostren imatges representatives de la immunotinció per MBP.

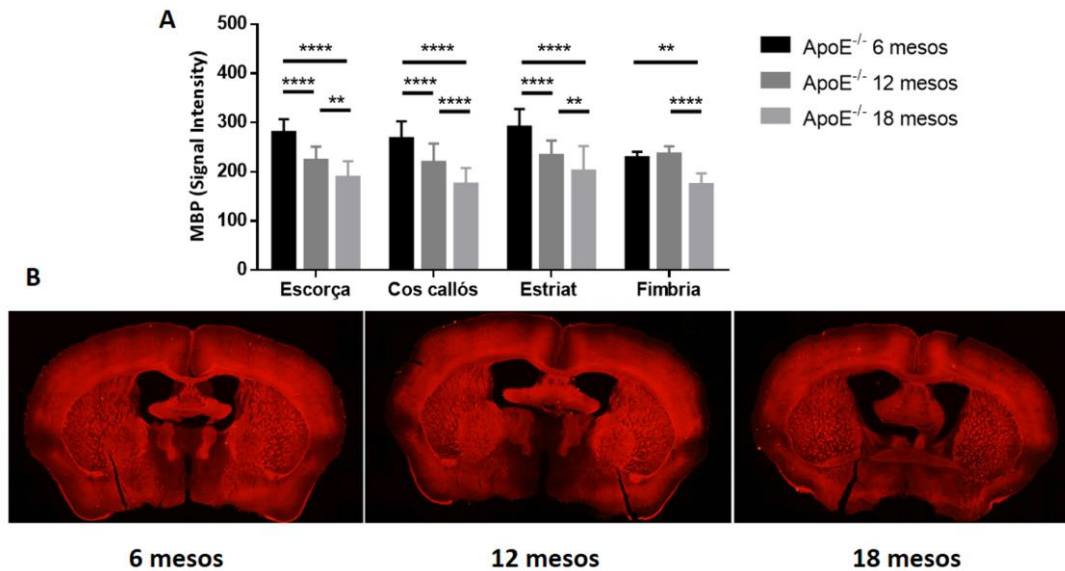


Figura 84. Alteracions en l'expressió de MBP amb l'envelliment en animals ApoE^{-/-}. **A)** Resultats expressats com en mitjana ± DE i analitzats utilitzant una prova Two-way ANOVA on *** s'associa a una $p < 0.01$ i **** a $p < 0.0001$. **B)** Imatges representatives de les tincions d'immunohistoquímica per MBP. Es van utilitzar ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=12), de 12 mesos (n=10) i de 18 mesos (n=8).

També es van estudiar alteracions a la substància blanca per tincions amb MBP degudes a l'aterosclerosi. La Figura 85 mostra els resultats de l'anàlisi dels canvis d'expressió de MBP comparant animals C57Bl6 i animals ApoE^{-/-}. En ratolins de 6 mesos es va observar una reducció de la expressió de MBP en ratolins ApoE^{-/-} (Figura 85A) a totes les regions estudiades ($p < 0.0001$). En canvi, en ratolins de 12 mesos es va detectar una reducció de la expressió de MBP a l'escorça ($p < 0.0001$), tal i com s'observa a la Figura 85B. Per últim i tal i com s'observa a la Figura 85C, no es van detectar diferències en la expressió de MBP entre ratolins C57Bl6 i ApoE^{-/-} de 18 mesos, exceptuant un puntual augment de la expressió de MBP en ratolins ApoE^{-/-} a l'estriat ($p = 0.0002$). Es va observar que, amb l'edat, les diferències entre soques van tendir a igualar-se tot i la petita diferència en ratolins de 18 mesos a l'estriat. Aquesta diferència podria deure's a que aquesta estructura, en concret, podria haver-se vist menys afectada per l'edat en aquests ratolins.

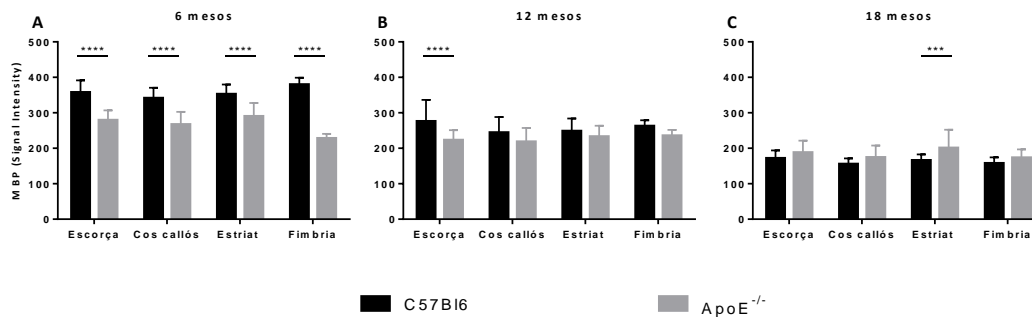


Figura 85. Efecte de l'aterosclerosi sobre la expressió de MBP. A) Canvis en la expressió de MBP en ratolins de 6 mesos. B) Canvis en la expressió de MBP en ratolins de 12 mesos. C) Canvis en la expressió de MBP en ratolins de 18 mesos. Resultats expressats en mitjana ± DE i analitzats amb Two-way ANOVA on * s'associa a p<0.05, ** a una p<0.01 i *** a p<0.001. Els resultats es mostren per duplicat per hemisferis en les dues soques: animals C57Bl6 de 6 mesos (n=4), 12 mesos (n=4) i 18 mesos (n=6) i animals ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=12), 12 mesos (n=10) i 18 mesos (n=8).

2.3.ALTERACIONS A LA SUBSTÀNCIA GRISA

La pèrdua de l'expressió de ApoE no només pot afectar a l'estructura i, consegüentment, la funció de les fibres de mielina, sinó que també pot produir alteracions en la supervivència cel·lular i en la irrigació cerebral que poden contribuir als canvis anatòmics produïts per l'envelliment en el gruix cortical.

Una de les limitacions de l'estudi ha sigut la restricció de temps i d'espais necessaris per expandir la colònia de ratolins ApoE^{-/-} amb la finalitat d'obtenir els animals necessaris de totes les edats d'estudi (mascles de totes les edats per comparar-los amb els seus corresponents C57Bl6). Per aquest motiu, es va decidir incloure les femelles als grups d'estudi ApoE^{-/-}. A posteriori, en el grup ApoE^{-/-} es va fer un anàlisi agrupant els resultats per gènere, que en relació al gruix cortical, va mostrar diferències de gènere.

El gruix cortical en mm del grup d'animals ApoE^{-/-} complet va ser 1.01 ± 0.04 en el grup de 6 mesos, 1.00 ± 0.03 en el de 12 mesos, i 0.98 ± 0.04 en el de 18 mesos, expressat com a mitjana ± desviació estàndard. El gruix cortical quan es tenien en compte només els mascles va ser 1.00 ± 0.04 en el grup de 6 mesos, 0.98 ± 0.02 en el grup de 12 mesos, i 0.97 ± 0.04 en el grup de 18 mesos, expressat com a mitjana ± desviació estàndard. Per últim, es va analitzar aquest paràmetre en femelles ApoE^{-/-}. Els resultats van ser 1.04 ± 0.03 en el grup de 6 mesos, 1.02 ± 0.03 en el grup de 12 mesos, i 0.99 ± 0.03 en el grup de 18 mesos, expressat com a mitjana ± desviació estàndard.

Tal i com s'observa en la Figura 86A, el gruix cortical es redueix significativament amb l'edat en ratolins ApoE^{-/-} (p=0.025). Mentre que els ratolins de 18 mesos tenen un menor gruix cortical respecte els de 6 mesos (p=0.00017), no s'han detectat diferències significatives en el gruix cortical dels animals de 12 mesos respecte els de 6 mesos (p=0.5351) ni dels animals de 18 mesos respecte els de 12 mesos (p=0.1515).

Els resultats de l'anàlisi tenint en compte només els mascles ApoE^{-/-} no va mostrar diferències significatives en les tres edats d'estudi (p=0.0584), tal i com es mostra a la Figura 86B. La Figura 86C mostra que la reducció del gruix cortical que es va trobar en el grup ApoE^{-/-} es manté quan s'analitzen les dades tenint en compte només les femelles ApoE^{-/-} (p=0.0024). Aquest fet, probablement es deu al dimorfisme sexual en animals ApoE^{-/-} on les femelles parteixen d'un gruix cortical lleugerament major que els mascles.

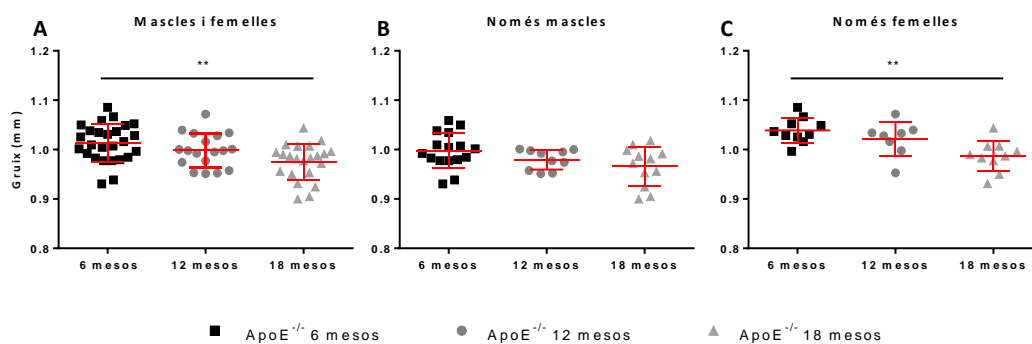


Figura 86. Efecte de l'envelliment sobre el gruix cortical en animals ApoE^{-/-}. **A)** Efecte de l'envelliment sobre el gruix cortical en ratolins ApoE^{-/-}. **B)** Efecte de l'envelliment sobre el gruix cortical en mascles ApoE^{-/-}. **C)** Efecte de l'envelliment sobre el gruix cortical en femelles ApoE^{-/-}. Resultats expressats en mitjana ± DE i analitzats amb One-way ANOVA on ** s'associa a una p<0.01. Els resultats es mostren per duplicat per hemisferis. Es van utilitzar ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=26), de 12 mesos (n=18) i de 18 mesos (n=22). D'aquests, 10 ratolins de 6 mesos, 8 de 12 mesos i 10 de 18 mesos van ser femelles.

A falta de completar l'estudi amb femelles C57Bl6, es pot dir que existeix un dimorfisme sexual, almenys en els animals ApoE^{-/-}, ja que des de l'inici de l'estudi, les femelles tenen un gruix cortical major respecte als mascles als 6 (p=0.0084) i 12 (p=0.0264) mesos, tal i com s'observa a la Figura 87. Aquestes diferències en el gruix cortical tendeixen a desaparèixer amb l'edat.

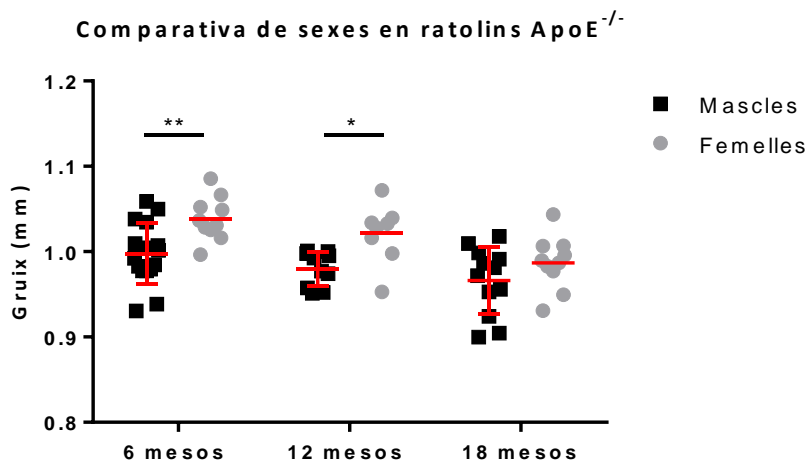


Figura 87. Efecte de l'envelliment sobre el gruix cortical en animals ApoE^{-/-} per gènere. Resultats expressats en mitjana ± DE i analitzats utilitzant la prova Two-way ANOVA on * s'associa a una p<0.05 i ** s'associa a una p<0.01. Els resultats estan duplicats per hemisferis i el tamany de la mostra és: mascles 6 mesos (n=16), mascles 12 mesos (n=10), mascles 18 mesos (n=12), femelles 6 mesos (n=10), femelles 12 mesos (n=8) i femelles 18 mesos (n=10).

Amb la finalitat de comprendre els canvis en el gruix cortical atribuïbles a l'aterosclerosi i tenint en compte aquest dimorfisme de gènere en el grup de ratolins ApoE^{-/-}, es va comparar els mascles C57Bl6 de les tres edats d'estudi amb el grup complet de ratolins ApoE^{-/-}, incloent les femelles i també es va comparar amb els corresponents mascles ApoE^{-/-}, tal i com s'observa a la figura 88.

Expressat com a mitjana ± desviació estàndard, el gruix cortical en mm dels ratolins C57Bl6 va ser 0.99 ± 0.04 en el grup de 6 mesos, 0.99 ± 0.02 en el grup de 12 mesos, i 0.96 ± 0.03 en el grup de 18 mesos.

Dins del grup d'animals ApoE^{-/-} els resultats del gruix cortical (mm) es va expressar tenint en compte el grup complet, és a dir, incloent les femelles, i tenint en compte només els mascles. Els resultats expressats com a mitjana ± desviació estàndard del gruix cortical en el primer cas va ser 1.01 ± 0.04 en el grup de 6 mesos, 1.00 ± 0.03 en el grup de 12 mesos, i 0.98 ± 0.04 en el grup de 18 mesos. En canvi, en el segon cas va ser 1.00 ± 0.04 en el grup de 6 mesos, 0.98 ± 0.02 en el grup de 12 mesos, i 0.97 ± 0.04 en el grup de 18 mesos, expressat com a mitjana ± desviació estàndard.

L'anàlisi de resultats no va mostrar diferències significatives en el gruix cortical entre les tres edats analitzades quan es tenen en compte tant mascles com femelles ApoE^{-/-}, tal com es mostra a la Figura 88A. Per evitar possibles emmascaraments deguts al dimorfisme de gènere, es van comparar només els mascles ApoE^{-/-} (p=0.9121) i es va

observar que el gruix cortical no canvia de forma significativa com a conseqüència de l'aterosclerosi (Figura 88B).

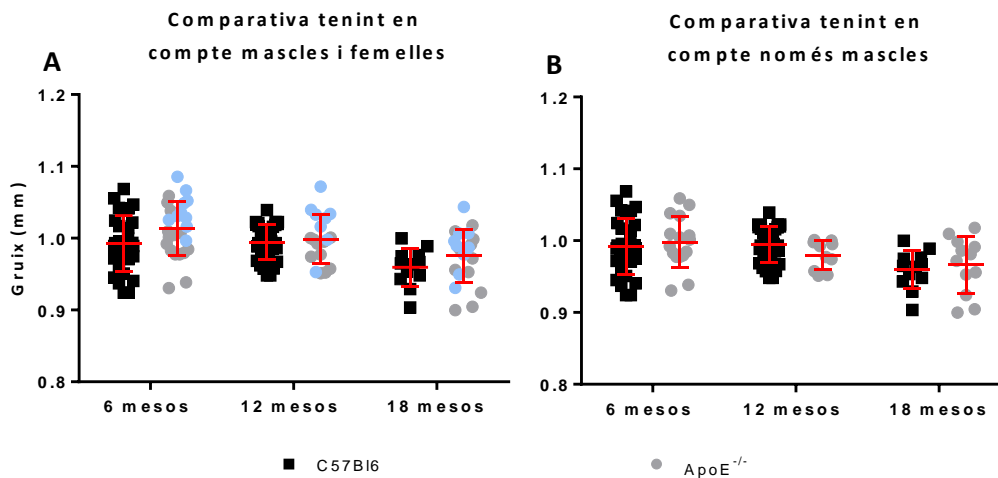


Figura 88. Efecte de l'aterosclerosi sobre el gruix cortical per edats. **A)** Canvis sobre el gruix cortical tenint en compte el grup complet d'animals ApoE^{-/-}. **B)** Canvis sobre el gruix cortical tenint en compte només els mascles ApoE^{-/-}. Resultats expressats en mitjana \pm DE i analitzats amb Two-way ANOVA. Es van utilitzar ratolins C57Bl6 de 6 mesos (n=15), 12 mesos (n=16) i 18 mesos (n=6). Es van utilitzar ratolins ApoE^{-/-} 6 mesos (n=13), de 12 mesos (n=9) i de 18 mesos (n=11). A la figura B es van excloure 5 femelles de 6 mesos, 4 de 12 mesos i 5 de 18 mesos.

2.4.ALTERACIONS EN LA CONDUCTA

Les alteracions en la conducta poden aparèixer com a conseqüència dels canvis vasculars que es produeixen amb envelliment, factors de risc o amb la presència de patologies cròniques. Tal i com s'ha explicat en la introducció, els tests d'avaluació neuropsicològica segueixen sent una de les eines més útils per al diagnòstic de demència. Els tests de comportament són les eines que equivalen a aquests tests en models animals. En aquests cas s'han avaluat canvis en la coordinació, la força motora i la capacitat exploratòria, tal i com s'observa a la Figura 89.

L'anàlisi de resultats va mostrar una reducció significativa en la coordinació motora ($p < 0.0001$) entre les tres edats analitzades (Figura 89A). Es va analitzar també la força muscular i es va detectar una reducció significativa en animals de 18 mesos ($p = 0.0056$), tal i com s'indica a la Figura 89B. També es van analitzar possibles alteracions en la capacitat exploratòria general, utilitzant dos paràmetres diferents, la distància recorreguda i la velocitat d'exploració. Mentre que l'anàlisi no va mostrar diferències estadísticament significatives en la velocitat ($p = 0.3082$), la distància recorreguda va

augmentar en animals ApoE^{-/-} de 12 mesos (p=0.0367), tal i com s'observa a les Figures 89C i 89D, respectivament.

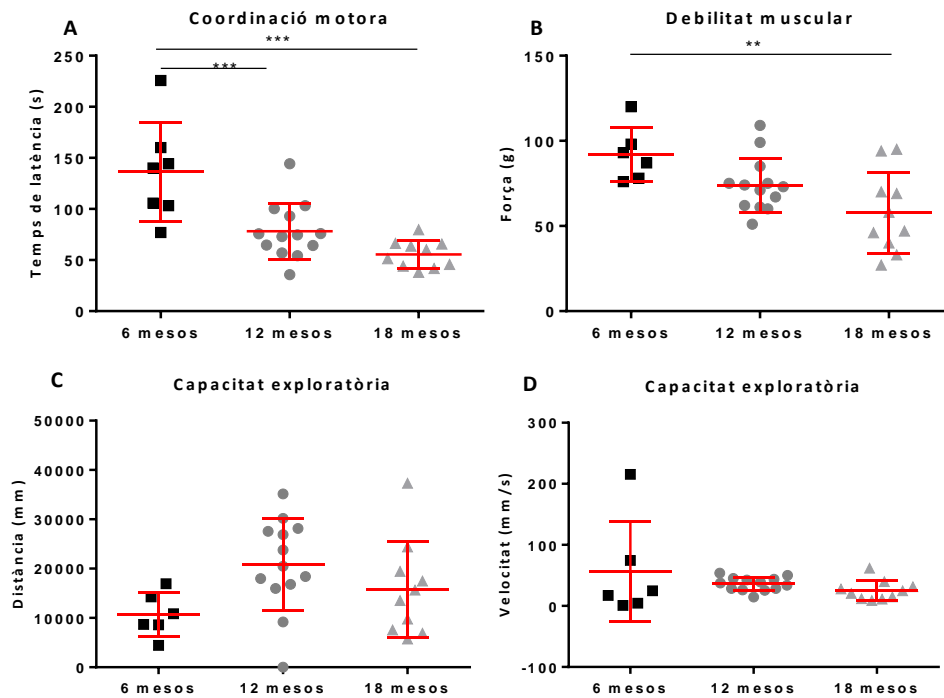


Figura 89. Alteracions en la conducta amb l'envelliment en animals ApoE^{-/-}. **A)** Efecte de l'envelliment sobre la coordinació motora. **B)** Efecte de l'envelliment sobre la força muscular. Efecte de l'envelliment sobre la capacitat exploratòria **(C)** i **(D)**. Resultats expressats en mitjana ± DE i s'han analitzat utilitzant la prova One-way ANOVA on ** s'associa a una p<0.01 i *** a una p<0.001. Es van utilitzar ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=7), de 12 mesos (n=13) i de 18 mesos (n=10).

Es va avaluar l'ansietat tal i com s'ha detallat en el primer apartat. Tal i com s'observa a la Figura 90, els ratolins ApoE^{-/-} passen més temps a prop de la zona perifèrica del camp obert (regió exterior) a totes les edats d'estudi (p<0.0001). No obstant, el percentatge de temps que passen a dins i el percentatge de temps que passen a fora no canvia amb l'edat en animals ApoE^{-/-} (p=0.9994).

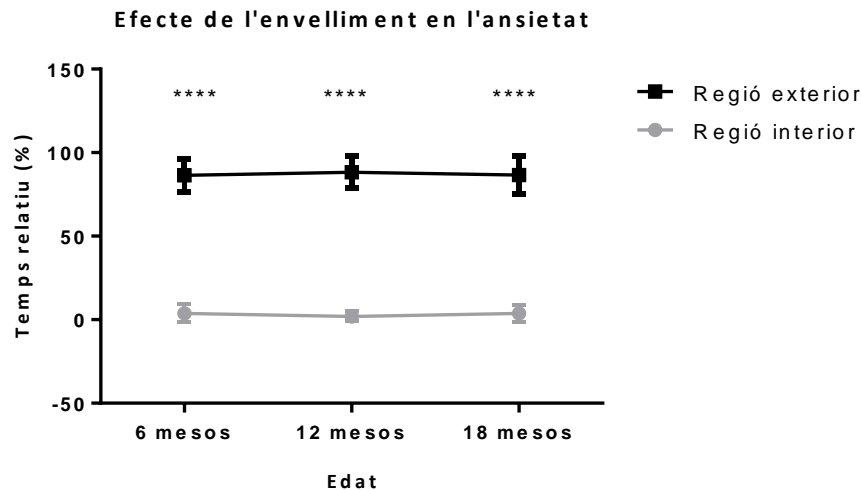


Figura 90. Efecte de l'envelliment en animals ApoE^{-/-} sobre l'ansietat. Resultats expressats en mitjana \pm DE i s'han analitzat utilitzant la prova Two-way ANOVA. Es van utilitzar ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=7), de 12 mesos (n=13) i de 18 mesos (n=10).

L'anàlisi comparatiu de la conducta en animals C57Bl6 i animals ApoE^{-/-} no va mostrar alteracions en la coordinació motora ni debilitat muscular associades a aterosclerosi (Figura 91A i Figura 91B, respectivament). No obstant, l'anàlisi post hoc va mostrar una major debilitat muscular ($p=0.0240$) i menor coordinació motora ($p<0.0001$) en ratolins ApoE^{-/-} de 18 mesos. Es van mesurar canvis en la capacitat exploratòria utilitzant la distància recorreguda i la velocitat d'exploració. Els resultats van mostrar una reducció significativa de la distància recorreguda en animals ApoE^{-/-} de 6 mesos, indicant un possible envelliment prematur degut a l'aterosclerosi, tal i com s'indica a la figura 91C.

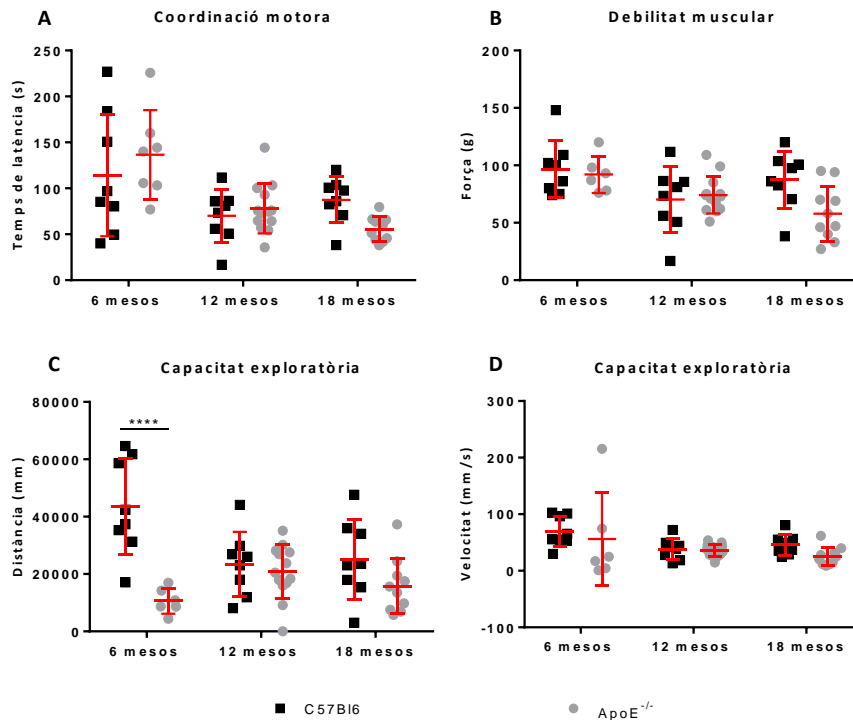


Figura 91. Efecte de l'aterosclerosi sobre la conducta. **A)** Alteracions en la coordinació motora associades a l'aterosclerosi. **B)** Alteracions en la força motora associades a l'aterosclerosi. Alteracions en la capacitat exploratòria associades a l'aterosclerosi (**C**) i (**D**). Resultats expressats en mitjana \pm DE i analitzats amb Two-way ANOVA amb post hoc Bonferroni on * s'associa a $p < 0.05$ i **** a $p < 0.00001$. S'han utilitzat 32 animals C57Bl6 11 animals de 6 mesos, 11 animals de 12 mesos i 10 de 18 mesos i 30 animals ApoE^{-/-}, 7 de 6 mesos, 13 de 12 mesos i 10 de 18 mesos.

La reducció de la capacitat exploratòria en animals ApoE^{-/-} de 6 mesos podria estar relacionada amb canvis en l'ansietat d'aquests animals. Per aquest motiu, es van analitzar les alteracions en l'ansietat en animals envellits degudes a l'aterosclerosi.

L'ansietat es va mesurar relacionant el temps que els animals passen a la part més interna i a la part més externa de la caixa, partint de la premissa de que eviten passar temps en espais oberts.

Per avaluar l'efecte que té l'aterosclerosi sobre l'ansietat, es va comparar el temps que els ratolins C57Bl6 i ApoE^{-/-} passaven a la part interna del camp obert, tal i com es mostra a la figura 92. L'anàlisi dels resultats va mostrar una reducció significativa del temps que els ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos passaven a la regió interior ($p = 0.0018$), indicant que a edats joves, la deficiència d'aquesta proteïna estaria lligada a un major nivell d'ansietat i que tendeix a igualar-se amb l'edat.

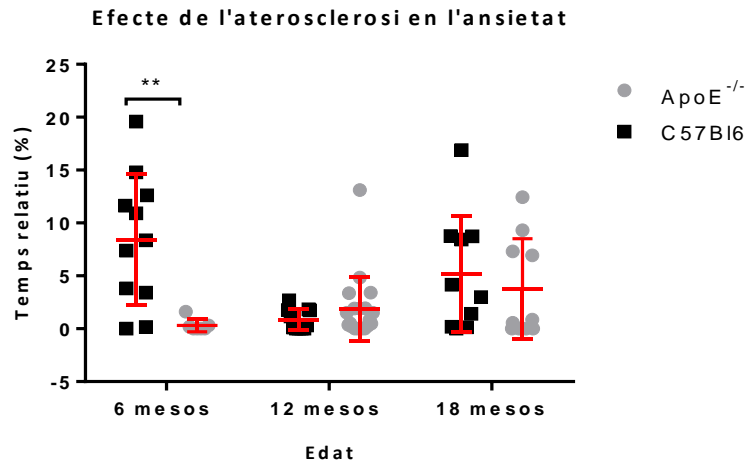


Figura 92. Efecte de l'aterosclerosi sobre l'ansietat en animals ApoE^{-/-} envellits. Resultats expressats en mitjana ± DE i analitzats amb Two-way ANOVA. S'han utilitzat 32 animals C57Bl6 11 animals de 6 mesos , 11 animals de 12 mesos i 10 de 18 mesos i 30 animals ApoE^{-/-}, 7 de 6 mesos , 13 de 12 mesos i 10 de 18 mesos.

3. HIPOPERFUSIÓ

Els models animals en demència tenen una gran limitació. Els rosegadors són fisiològicament molt resistents a la hipoperfusió. El model animal de demència que es va utilitzar en aquest estudi és el model d'estenosi bilateral asimètrica de les artèries caròtides comunes (ACAS) per la seva semblança al que es produeix en clínica. Es van fer animals SHAM i es va observar que la operació per se no té efectes en els diferents paràmetres estudiats. Per aquest motiu, no es mostraran les dades d'aquests animals.

3.1.ALTERACIONS VASCULARS

3.1.1. Alteracions en la macrovasculatura

El model d'hipoperfusió ACAS es caracteritza per ser progressiu, ja que l'anell ameroïde produeix una oclusió gradual de l'artèria caròtida comuna dreta amb el temps. Aquesta oclusió produeix canvis morfològics detectables mitjançant angiografia TOF, longitudinalment. Tot i que la cirurgia ACAS produeix canvis en la morfologia del sistema carotídi que irriga el cervell, aquests canvis podrien afectar també l'artèria basilar. Un dels principals canvis morfològics visualment més destacables és la pèrdua de senyal de l'artèria caròtida interna dreta (Figura 93).

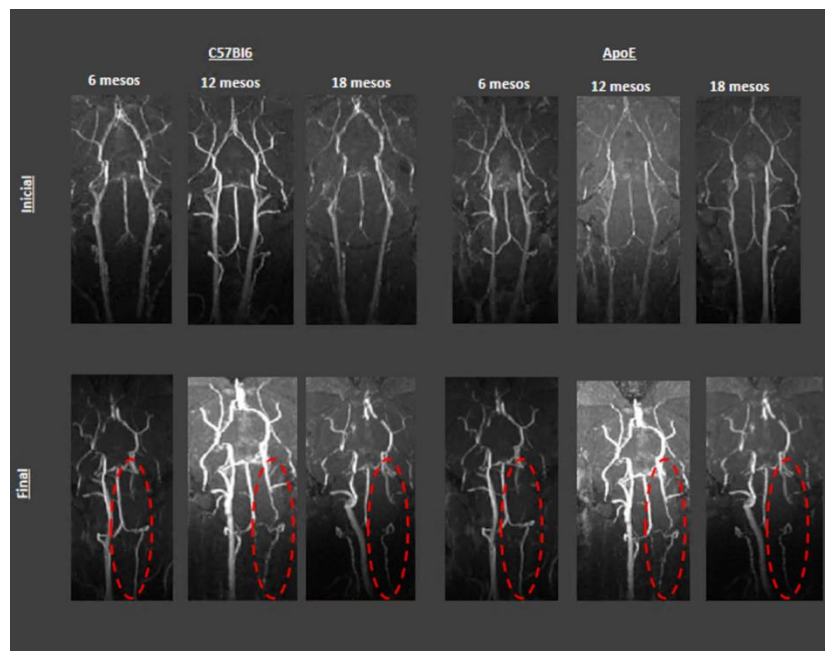


Figura 93. Imatges representatives de les alteracions en la morfologia de les principals artèries que irriguen el cervell per angiografia TOF. En vermell s'ha encerclat la pèrdua de senyal a l'artèria caròtida interna dreta.

Les primeres imatges d'angiografia TOF es van adquirir abans de la inducció d'hipoperfusió (inicial), i es va realitzar un seguiment longitudinal de fins a dos mesos després de la cirurgia ACAS (final). Es van analitzar canvis en la longitud de l'artèria basilar i les artèries caròtides internes de manera longitudinal, en les dues soques i a les tres edats d'estudi. A la Figura 94 es mostren els resultats de les dades d'angiografia TOF en ratolins de 6 mesos C57Bl6 i ApoE^{-/-} a 7 i 28 dies i 2 mesos després d'induir hipoperfusió. L'anàlisi de les dades no va mostrar diferències significatives en l'artèria basilar, la longitud de la qual no va canviar ni amb la hipoperfusió (p=0.5197) ni entre ratolins C57Bl6 i ApoE^{-/-} (p=0.3471), tal i com s'observa a la Figura 94A. En canvi, en ratolins de 6 mesos es va produir una reducció de la longitud de l'artèria caròtida interna dreta amb el temps deguda a la hipoperfusió (p=0.0027), i els animals ApoE^{-/-} es van comportar d'una forma diferent (p=0.0006) als C57Bl6. Tal i com s'observa a la figura 94B, els ratolins ApoE^{-/-} van presentar una menor longitud de l'artèria caròtida interna dreta als 2 mesos (p=0.0417), indicant possiblement una menor capacitat de compensació vascular a la hipoperfusió crònica.

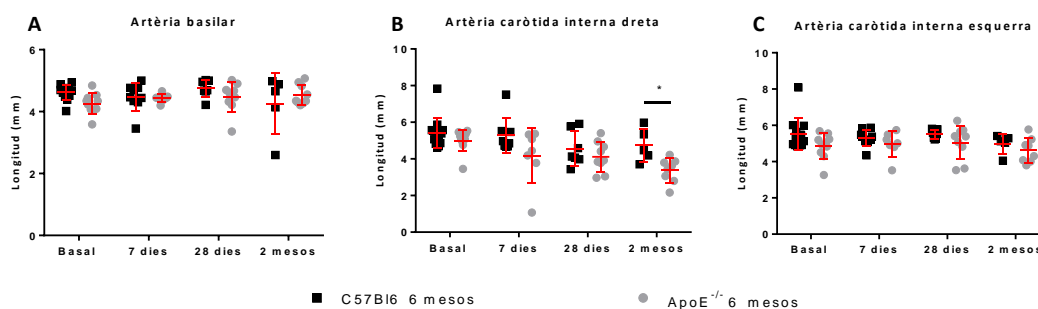


Figura 94. Canvis microvasculars en la longitud de les principals artèries que irriguen el cervell en ratolins de 6 mesos. **A)** Longitud artèria basilar. **B)** Longitud artèria caròtida interna dreta. **C)** Longitud artèria caròtida interna esquerra. Resultats expressats com a mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA amb post hoc Bonferroni on * s'associa a $p < 0.05$. Es van utilitzar 15 ratolins C57Bl6 i 13 ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos.

L'anàlisi de la longitud de les artèries esmentades en ratolins de 12 mesos va mostrar una reducció de la longitud de l'artèria basilar (p=0.0096), artèria caròtida interna dreta (p<0.0001) i artèria caròtida interna esquerra (p=0.0394) en els animals ApoE^{-/-}, tal i com s'observa a la figura 95. La hipoperfusió no va produir canvis significatius a l'artèria basilar en animals de 12 mesos (Figura 95A). En canvi, l'artèria caròtida interna dreta dels ratolins ApoE^{-/-} de 12 mesos va reduir-se més a partir dels 7 dies post-cirurgia (Figura 95B).

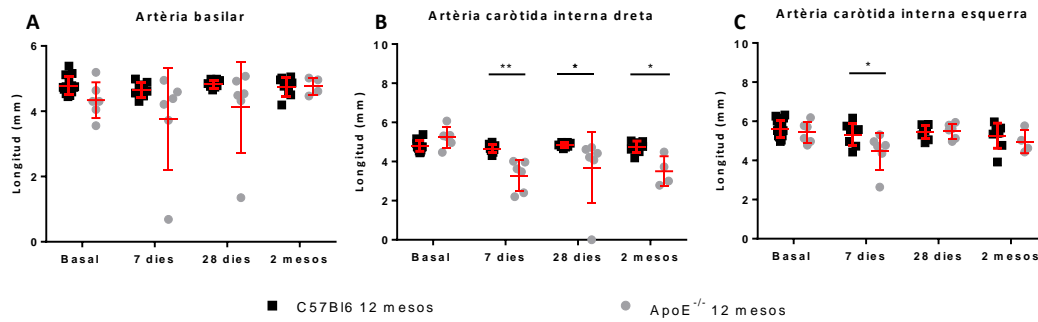


Figura 95. Canvis microvasculars en la longitud de les principals artèries que irriguen el cervell en ratolins de 6 mesos. **A)** Longitud artèria basilar. **B)** Longitud artèria caròtida interna dreta. **C)** Longitud artèria caròtida interna esquerra. Resultats expressats com a mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA amb post hoc Bonferroni on * s'associa a $p < 0.05$. S'han utilitzat 16 ratolins C57Bl6 de 12 mesos i 9 ratolins ApoE^{-/-} de 12 mesos.

En canvi, en ratolins de 18 mesos no es van trobar diferències entre C57Bl6 i ApoE^{-/-}, excepte en relació a l'artèria caròtida interna dreta, tal i com s'observa a la Figura 96. Es va detectar una reducció de la longitud de l'artèria caròtida interna dreta amb la hipoperfusió ($p < 0.0001$), que no es va trobar en la resta d'artèries estudiades en animals de 18 mesos (Figura 96B).

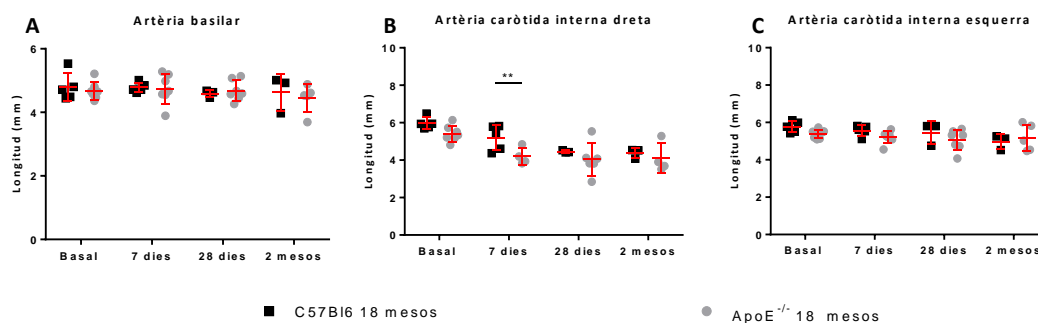


Figura 96. Canvis microvasculars en la longitud de les principals artèries que irriguen el cervell en ratolins de 6 mesos. **A)** Longitud artèria basilar. **B)** Longitud artèria caròtida interna dreta. **C)** Longitud artèria caròtida interna esquerra. Resultats expressats com a mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA amb post hoc Bonferroni on ** s'associa a $p < 0.01$. S'han utilitzat 6 ratolins C57Bl6 de 18 mesos i 11 ratolins ApoE^{-/-} de 18 mesos.

Tal i com ja s'ha esmentat anteriorment, el grup d'animals ApoE^{-/-} inclou mascles i femelles amb la finalitat d'incrementar el mida de la mostra. L'anàlisi de les dades d'imatges d'angiografia TOF en el grup d'animals ApoE^{-/-} es va realitzar, en primer lloc, en mascles i femelles per separat. En no trobar-se diferències significatives, es van analitzar tots els animals junts. Per aquest motiu, es mostren els resultats dels ratolins ApoE^{-/-} al complet.

La hipoperfusió crònica pot produir canvis progressius en les artèries caròtides comunes, cosa que pot induir canvis en la perfusió cerebral. Es van fer servir imatges de perfusió ASL per detectar els possibles canvis en la perfusió cerebral. D'aquestes imatges es van extreure els mapes de rCBF que es mostren a la Figura 97. Tal i com s'ha explicat a l'apartat metodològic, es va realitzar un estudi dels canvis en la perfusió cerebral amb mesures del cervell complet, per hemisferis i també per regions d'interès com ara, l'escorça i l'estriat.

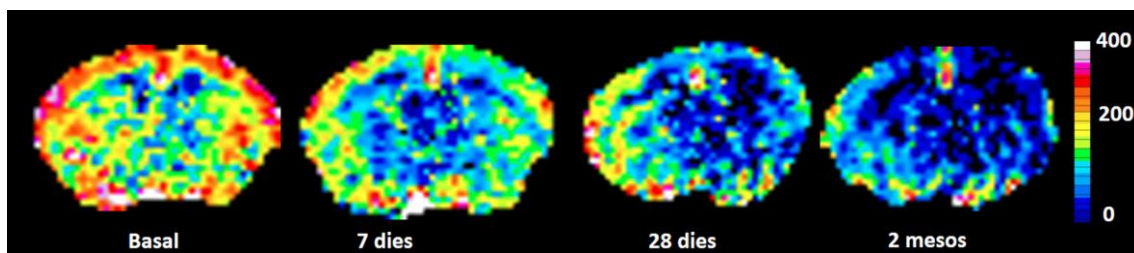


Figura 97. Mapes de rCBF representatius dels canvis de perfusió cerebral produïts per la hipoperfusió. Elaboració pròpia.

A l'apartat anterior s'ha detectat diferències en el rCBF en animals de 12 i 18 mesos tenint en compte dades de rCBF per hemisferis. En aquest cas, es van analitzar les dades de rCBF del cervell total en ratolins ApoE^{-/-} i C57Bl6 a les tres edats d'estudi longitudinalment (Figura 98). Les diferències en el rCBF en estat basal en animals de 12 mesos ($p=0.0042$) es van mantenir (Figura 98B). L'anàlisi estadístic es va realitzar emprant la prova Two-way ANOVA, que va mostrar diferències atribuïbles al factor soca en ratolins de 6 i 12 mesos. Aquestes diferències no es van trobar en animals envellits de 18 mesos ($p=0.8539$), tal i com mostra la Figura 98C. No obstant, es va trobar una reducció del rCBF amb la hipoperfusió en ratolins de 6 mesos ($p=0.0159$), de 12 mesos ($p=0.0031$) i de 18 mesos ($p<0.0001$).

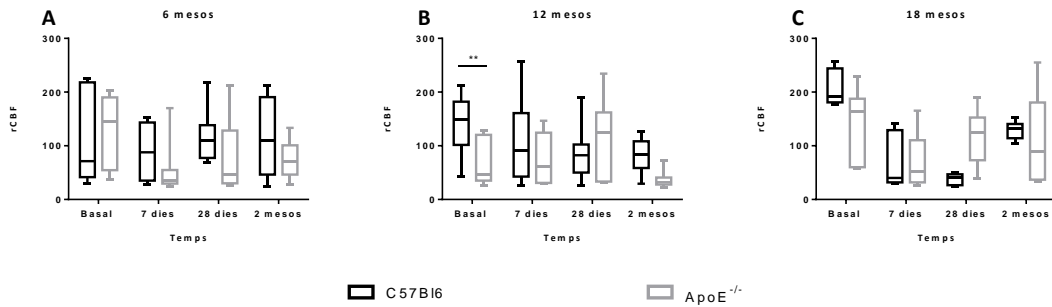


Figura 98. Canvis en la perfusió cerebral produïts per la hipoperfusió en ratolins C57Bl6 i ApoE^{-/-} a les tres edats d'estudi. **A)** Ratolins de 6 mesos. El tamany de la mostra va ser 15 ratolins C57Bl6 i 13 ApoE^{-/-}. **B)** Ratolins de 12 mesos. Es van utilitzar 16 ratolins C57Bl6 i 9 ApoE^{-/-}. **C)** Ratolins de 18 mesos. es van utilitzar animals C57Bl6 (n=6) i ApoE^{-/-} (n=11). Resultats expressats en mitjana ± DE i analitzats mitjançant Two-way ANOVA on ** s'associa a p<0.01.

La asimetria del model d'hipoperfusió sobre les artèries caròtides comunes podria produir alteracions asimètriques en el flux sanguini cerebral. Es van avaluar aquests canvis per hemisferis als 2 mesos de la inducció de la hipoperfusió (Figura 99). Els ratolins ApoE^{-/-} van mostrar un rCBF menor en tots els hemisferis i en tots els temps estudiats, respecte els animals C57Bl6, tot i que aquestes diferències només van ser significatives als 12 mesos (p=0.0155 a l'hemisferi dret i p=0.0002 a l'hemisferi esquerre). Els valors de rCBF que ofereix la perfusió ASL són molt variables entre ratolins, possiblement relacionat amb el fet d'estar anestesiats en sessions de ressonància de més d'una hora. Això, unit al fet de una n reduïda en algun dels grups, pot influir en el resultat final.

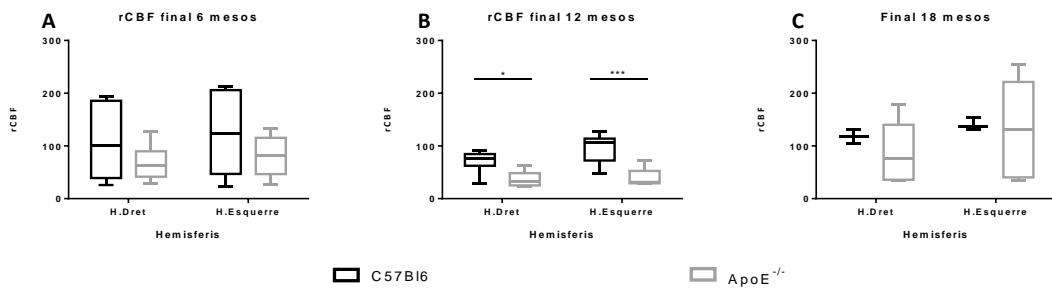


Figura 99. Efecte asimètric de la hipoperfusió dos mesos després de la cirurgia ACAS comparant les dues soques a les diferents edats d'estudi. **A)** rCBF final en animals de 6 mesos. **B)** rCBF final en ratolins de 12 mesos. **C)** rCBF final en animals de 18 mesos. Resultats expressats en mitjana ± DE i analitzats mitjançant Two-way ANOVA on * s'associa a p<0.05 i ** a p<0.01. Per una banda, s'han utilitzat ratolins C57Bl6 de 6 mesos (n=6), de 12 mesos (n=9) i de 18 mesos (n=3). D'altra banda, s'han utilitzat ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=9), de 12 mesos (n=5) i de 18 mesos (n=5).

Es va analitzar el rCBF en les diferents regions d'interès i no es van trobar diferències significatives atribuïbles als hemisferis excepte a l'estriat en animals ApoE^{-/-}

de 18 mesos ($p=0.0216$), fet que indicaria que possiblement compensen pitjor l'oclusió de l'artèria caròtida interna dreta que la resta de grups (Figura 100). No es van trobar diferències degudes al gènere en els ratolins ApoE^{-/-}. Per aquest motiu, es van agrupar les dades i es va comparar el rCBF a l'escorça i a l'estriat entre C57Bl6 i ApoE^{-/-} a les diferents edats d'estudi longitudinalment.

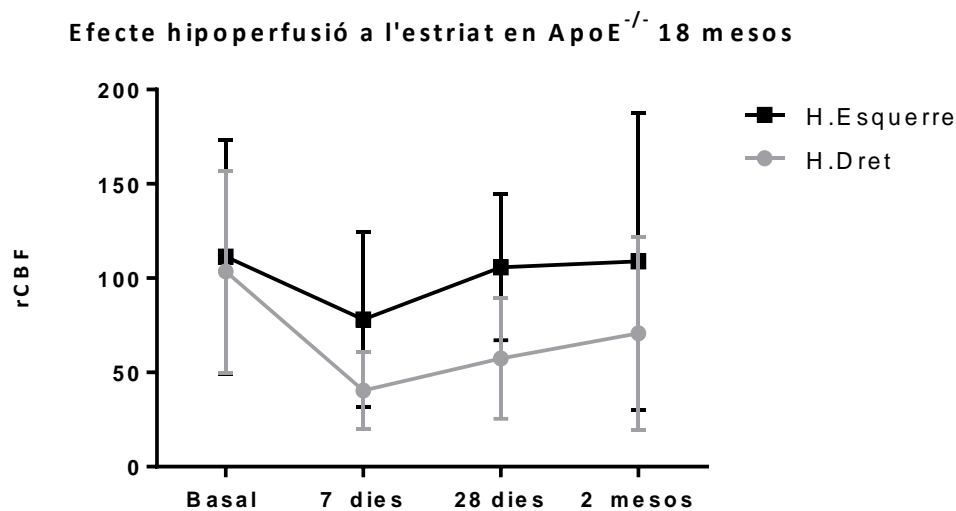


Figura 100. Efecte de la hipoperfusió a l'estriat en ratolins ApoE^{-/-} de 18 mesos. Resultats expressats com a mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA, post hoc Bonferroni. Tamany de la mostra: 11 ratolins ApoE^{-/-} de 18 mesos.

A la Figura 101 es mostren els resultats de l'anàlisi del rCBF a l'escorça per soques a les tres edats d'estudi. Es va trobar una reducció del rCBF amb la hipoperfusió en ratolins de 6 mesos ($p<0.0001$), de 12 mesos ($p=0.0004$) i de 18 mesos ($p<0.0001$). A més, es va trobar una reducció del rCBF en ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos ($p=0.0081$) i en animals de 12 mesos ($p<0.0001$). Aquesta reducció del rCBF no es va detectar en animals de 18 mesos ($p=0.8301$), indicant que a edats més envellides es perd la capacitat de compensació, independentment de la soca.

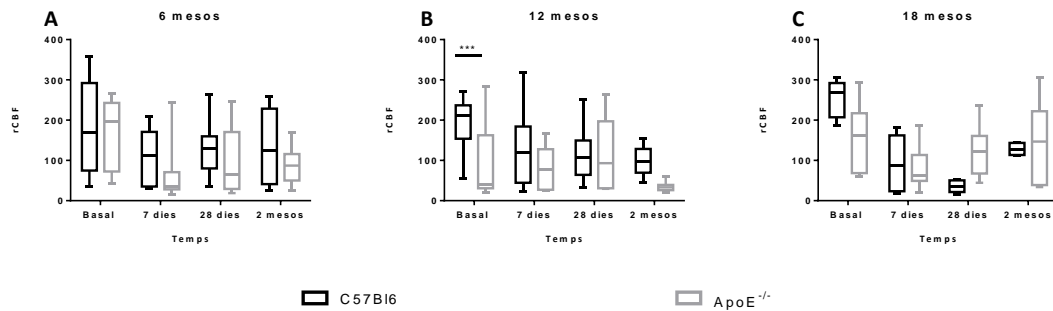


Figura 101. Alteracions en el rCBF a l'escorça en ratolins C57Bl6 i ApoE^{-/-} a les tres edats d'estudi. **A)** Ratolins de 6 mesos. **B)** Ratolins de 12 mesos. **C)** Ratolins de 18 mesos. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA, post hoc Bonferroni. Per una banda, s'han utilitzat ratolins C57Bl6 de 6 mesos (n=15), de 12 mesos (n=16) i de 18 mesos (n=6). D'altra banda, s'han utilitzat ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=13), de 12 mesos (n=9) i de 18 mesos (n=11).

L'anàlisi del rCBF a l'estriat per soques a les tres edats d'estudi va mostrar una reducció del rCBF amb la hipoperfusió en ratolins de 6 mesos ($p < 0.0001$) i de 18 mesos $p < 0.0001$, però no en ratolins de 12 mesos ($p = 0.0530$). A més, es va trobar una reducció del rCBF en ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos ($p = 0.0032$), de 12 mesos ($p < 0.0001$) i en els de 18 mesos ($p = 0.0061$). Aquesta reducció del rCBF en ratolins ApoE^{-/-} no es dona només amb la hipoperfusió, sinó també en estat basal en ratolins de 12 ($p < 0.0001$) i 18 mesos ($p < 0.0001$), tal i com s'observa a les Figures 102B i 102C, respectivament.

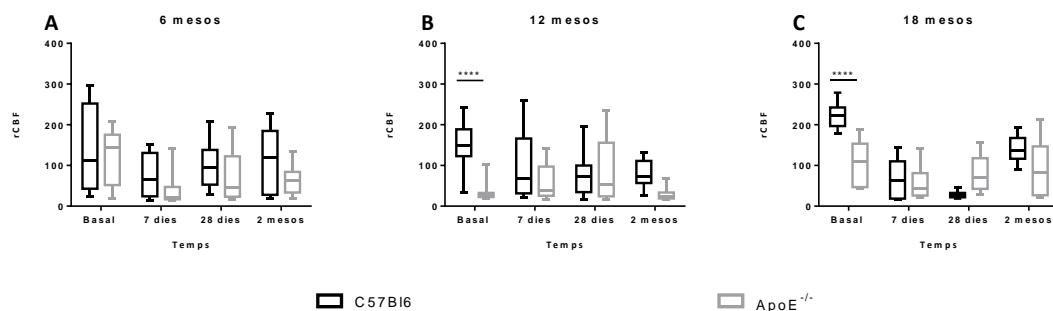


Figura 102. Alteracions en el rCBF a l'estri en ratolins C57Bl6 i ApoE^{-/-} a les tres edats d'estudi. **A)** Ratolins de 6 mesos. **B)** Ratolins de 12 mesos. **C)** Ratolins de 18 mesos. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA, post hoc Bonferroni. Per una banda, s'han utilitzat ratolins C57Bl6 de 6 mesos (n=15), de 12 mesos (n=16) i de 18 mesos (n=6). D'altra banda, s'han utilitzat ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=13), de 12 mesos (n=9) i de 18 mesos (n=11).

3.1.2. Alteracions en la microvasculatura

Tal i com s'esmenta en la introducció, l'origen del deteriorament cognitiu de tipus vascular està estretament lligat a la patologia vascular cerebral de tipus isquèmic o hemorràgic. Les lesions vasculares produeixen canvis patològics en la conducta com, per exemple, alteracions en la funció executiva, pèrdua de memòria, trastorns d'atenció i concentració i canvis afectius com l'apatia. En la major part dels casos on s'han trobat aquestes alteracions conductuals, s'han detectat també alteracions hemodinàmiques. Les alteracions hemodinàmiques com, per exemple, malalties cardiovasculars (arítmies o hipotensió) o la malaltia pulmonar obstructiva crònica o l'apnea de la son poden produir episodis repetitius d'hipoperfusió o d'hipòxia, que, a partir d'una necrosi selectiva (hipocamp o necrosi laminar cortical) pot ser l'origen del deteriorament cognitiu.

Es creu que els pacients amb dany cognitiu de tipus vascular presenten una alteració de l'acoblament del flux sanguini cerebral microvascular i de la densitat microvascular, que podria alterar l'intercanvi de gasos i nutrients front la resposta d'hiperèmia, produint dany tissular. Per aquest motiu, es va analitzar la densitat microvascular en ratolins C57Bl6 i ratolins ApoE^{-/-} a diferents edats d'estudi, exposats a la hipoperfusió crònica *in vivo* i *ex vivo*, utilitzant els dos mètodes explicats anteriorment (índex Q i imatges d'alta resolució per microscòpia).

Es va realitzar l'anàlisi de l'índex Q i de les imatges d'alta resolució per microscòpia per hemisferis ja que el model ACAS podria estar produint alteracions en la densitat microvascular de forma asimètrica. L'anàlisi dels resultats no va mostrar diferències significatives entre hemisferis, de forma que es van agrupar les dades. Amb aquesta agrupació, no es van trobar diferències estadísticament significatives entre les dades basals i finals (2 mesos després de la cirurgia) ni en els C57Bl6 ni en els ApoE^{-/-} en cap de les estructures d'estudi. En canvi, quan es van comparar les dades finals (2 mesos després de la cirurgia) entre C57Bl6 i ApoE^{-/-} de les tres edats d'estudi es va trobar una reducció de l'índex Q a l'hipocamp en animals de 6 mesos ($p=0.0019$), que no es manté en la resta d'edats d'estudi, tal i com s'indica a la Figura 103. Aquesta diferència no es

va trobar en la resta de regions estudiades (escorça, estriat i tàlem), indicant que la estructura més sensible a la hipoperfusió a edats joves seria l'hipocamp.

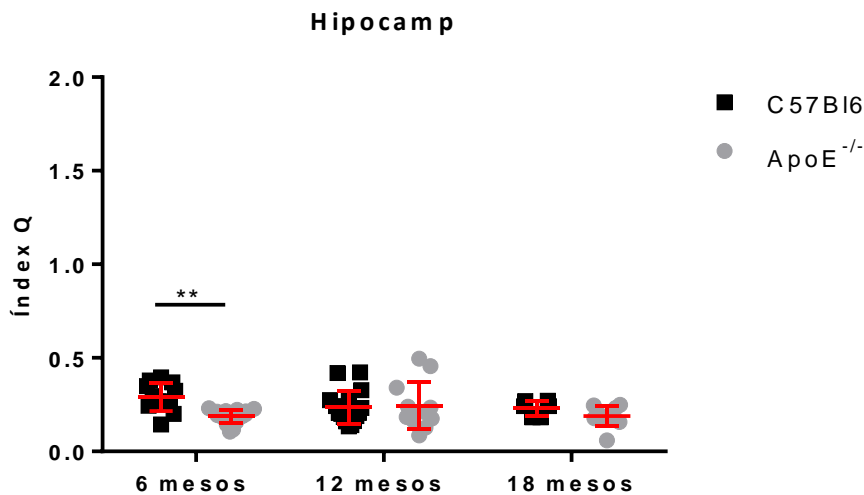


Figura 103. Densitat microvascular mesurada *in vivo* mitjançant l'índex Q comparant les dades finals de ratolins C57Bl6 i ApoE^{-/-}. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb el test Two-way ANOVA on ** s'associa a una p<0.001. Es van utilitzar ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=18), de 12 mesos (n=12) i de 18 mesos (n=10) i ratolins C57Bl6 de 6 mesos (n=12), de 12 mesos (n=16) i de 18 mesos (n=6)

En l'estudi *ex vivo* de la densitat microvascular tampoc es van trobar diferències significatives entre hemisferis i també es van analitzar conjuntament. D'aquesta manera, com es van utilitzar 3 cervells per grup i per grups d'edats, la mida de la mostra sempre inclou 6 valors per soca i edat.

A diferència de l'estudi *in vivo*, es va detectar una clara tendència a la reducció de la densitat microvascular després de hipoperfusió crònica en ratolins C57Bl6 de 6 i 12 mesos, que era estadísticament significativa a l'escorça en ratolins de 6 mesos (p<0.001), a l'hipocamp (p=0.0002) en animals de 6 (p=0.0028) i 12 (p=0.0006) mesos, i al tàlem en animals de 12 mesos (p=0.0061), tal i com s'observa a la Figura 104. No es van trobar canvis significatius a nivell de l'estriat.

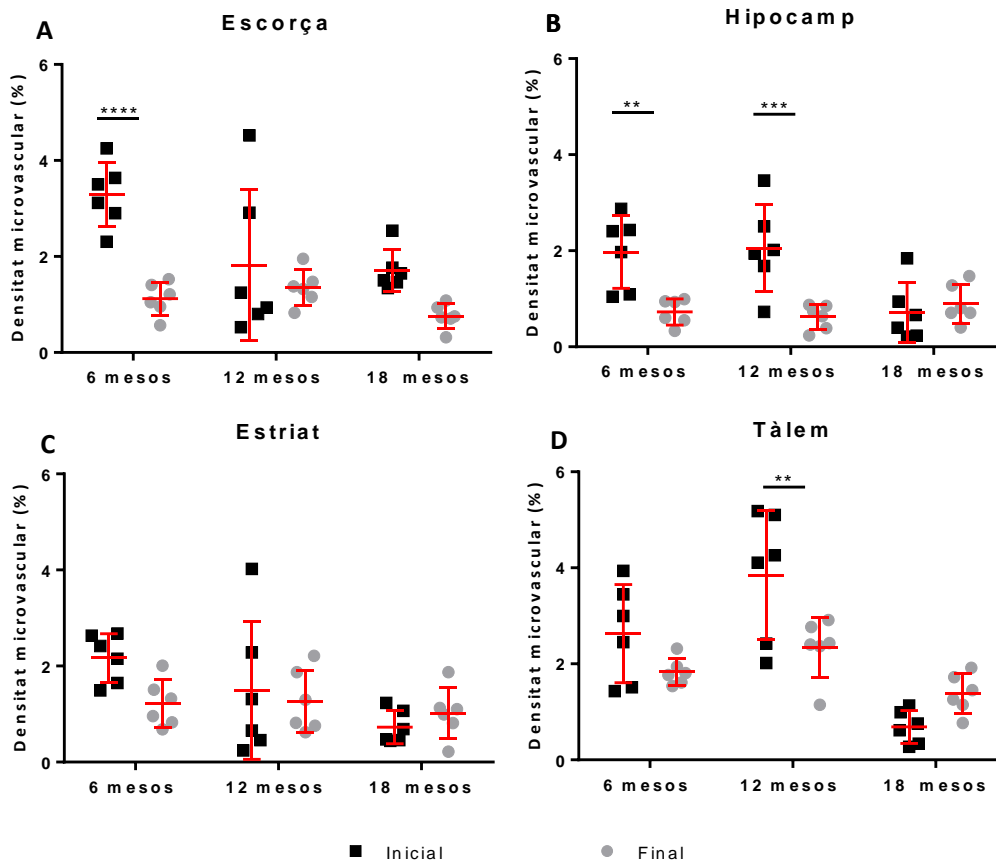


Figura 104. Efecte de la hipoperfusió sobre la densitat microvascular (%) en ratolins C57Bl6. **A)** Densitat microvascular a l'escorça. **B)** Densitat microvascular a l'hipocamp. **C)** Densitat microvascular a l'estriat. **D)** Densitat microvascular al tàlem. Resultats expressats com a mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA. Tamany de la mostra ratolins C57Bl6: 6 mesos (n=6), 12 mesos (n=6), 18 mesos (n=6).

A diferència dels ratolins C57Bl6, l'anàlisi post hoc de la densitat microvascular (%) en animals ApoE^{-/-} no va permetre detectar diferències significatives en cap de les regions estudiades (Figura 105). No obstant, els resultats de la prova Two-way ANOVA van permetre detectar una reducció significativa de la densitat microvascular a l'estriat (p=0.0443) i al tàlem (0.0079), tal i com s'observa a les Figures 105C i D, respectivament. Mentre que a l'escorça no es van trobar diferències significatives (p=0.1448), a l'hipocamp es va trobar una tendència a la reducció de la densitat microvascular (p=0.0622), que a l'anàlisi post hoc va resultar ser estadísticament significatiu en animals de 6 mesos (p=0.0003).

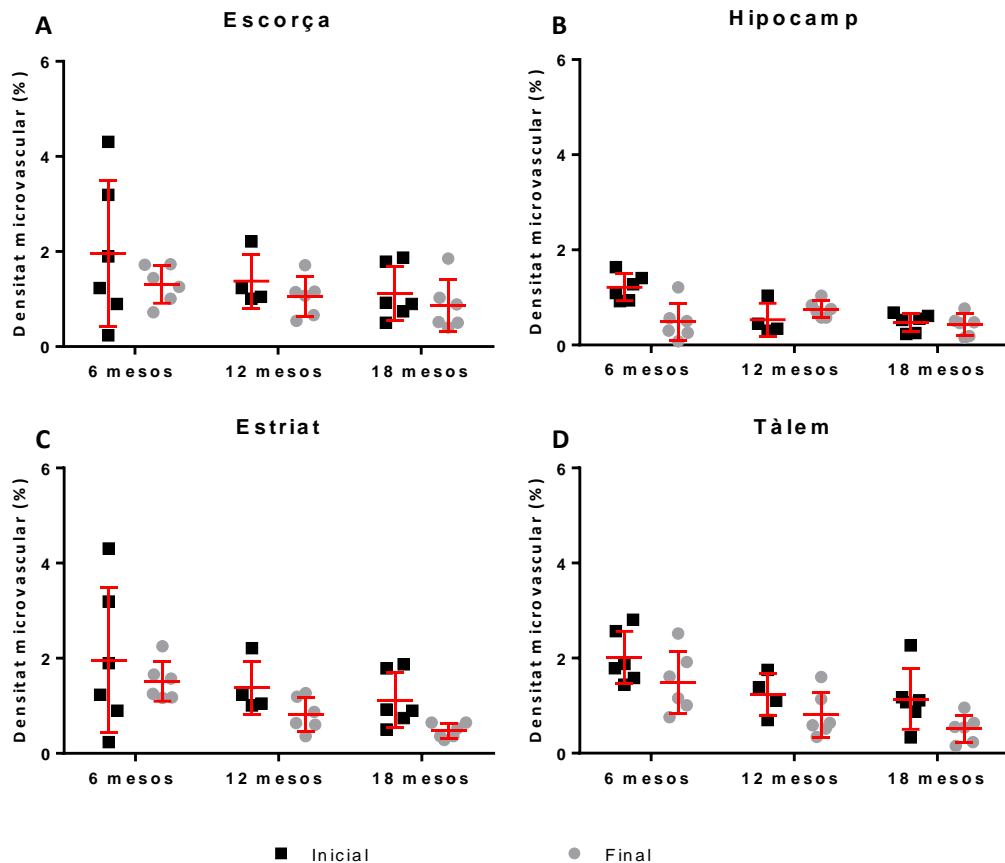


Figura 105. Efecte de la hipoperfusió sobre la densitat microvascular (%) en ratolins ApoE^{-/-}. **A)** Densitat microvascular a l'escorça. **B)** Densitat microvascular a l'estriat. **C)** Densitat microvascular a l'hipocamp. **D)** Densitat microvascular al tàlem. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA. Tamany de la mostra ratolins ApoE^{-/-}: 6 mesos (n=6), 12 mesos (n=6), 18 mesos (n=6).

A l'apartat anterior es van mostrar les diferències en la densitat microvascular (%) entre C57Bl6 i ApoE^{-/-} a les diferents edats d'estudi. En el cas de la hipoperfusió crònica, es van comparar els valors finals de les dues soques. Només es van detectar diferències entre soques al tàlem, tal i com s'indica a la Figura 106.

L'anàlisi de la densitat microvascular comparant C57Bl6 i ApoE^{-/-} va permetre detectar alteracions al tàlem ($p < 0.0001$) i una tendència la reducció de la densitat microvascular a l'hipocamp ($p = 0.0628$). La hipoperfusió va produir una reducció de la densitat microvascular al tàlem que es va iniciar en ratolins de 12 mesos ($p < 0.0001$) i es va mantenir ($p = 0.0113$) en ratolins ApoE^{-/-} de 18 mesos (Figura 106D). Tot i que a l'hipocamp només es va trobar una tendència a que la densitat microvascular es reduís en ratolins ApoE^{-/-}, l'anàlisi post hoc va mostrar una menor densitat microvascular en

ratolins ApoE^{-/-} de 18 mesos (Figura 106B). No es van trobar diferències significatives a l'escorça (Figura 106A) i a l'estriat (Figura 106C).

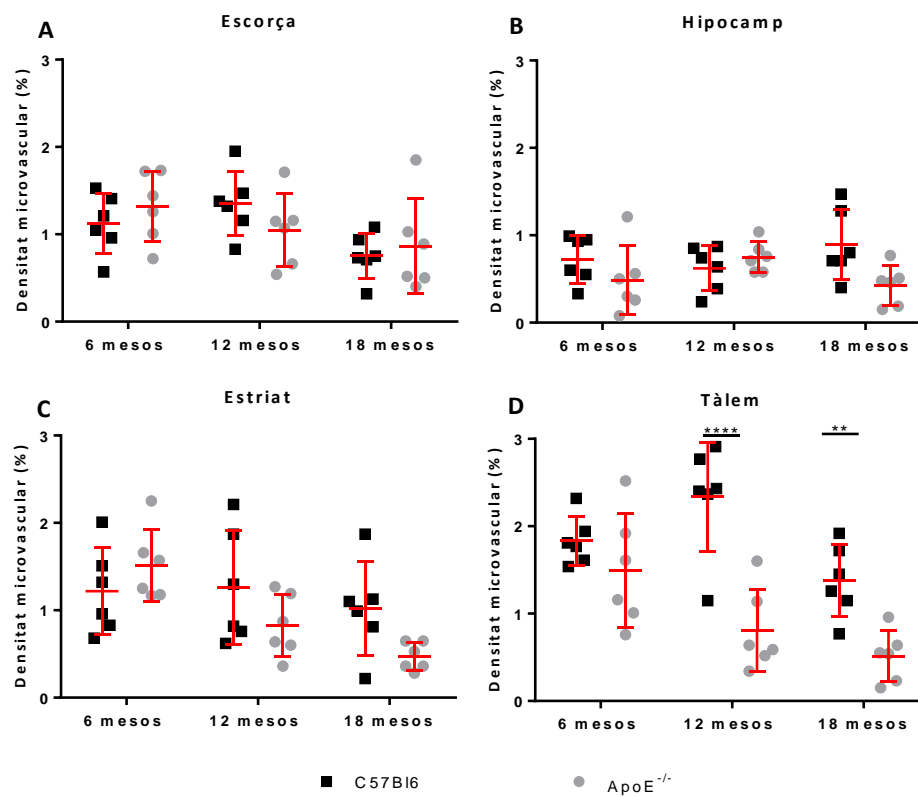


Figura 106. Comparativa de la densitat microvascular (%) final entre C57Bl6 i ApoE^{-/-}. **A)** Densitat microvascular a l'escorça. **B)** Densitat microvascular a l'estriat. **C)** Densitat microvascular a l'hipocamp. **D)** Densitat microvascular al tàlem. Resultats expressats com a mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on ** s'associa a $p < 0.01$ i *** a $p < 0.001$. Tamany de la mostra ratolins C57Bl6: 6 mesos (n=6), 12 mesos (n=6), 18 mesos (n=6). Tamany de la mostra ratolins ApoE^{-/-}: 6 mesos (n=6), 12 mesos (n=6), 18 mesos (n=6).

3.2.ALTERACIONS A LA SUBSTÀNCIA BLANCA

El model d'hipoperfusió escollit representa millor la hipoperfusió en humans per la seva asimetria. La estenosi progressiva que es produeix a l'artèria caròtida comuna dreta reproduïx les alteracions cerebrals característiques del VCI a l'hemisferi dret, com poden ser els múltiples infarts subcorticals. En canvi, a l'hemisferi esquerre es pretén mimetitzar la leucoaraiosi, com a seqüela de la hipoperfusió. L'interès de l'estudi de les alteracions en la mielina per DTI recau en detectar quins índexs s'alteren amb la hipoperfusió i el seu significat (pèrdua de gruix de les beines de mielina, afectació dels axons, augment de l'edema o contingut d'aigua al teixit, entre d'altres). Per això ens centrem en l'anàlisi de l'anisotropia fraccional, que ens indica com de direccional és la difusió de l'aigua, i en la difusivitat mitjana, que ens informa sobre quant es difon l'aigua.

Es van estudiar les alteracions en la mielina *in vivo* mitjançant una seqüència curta, de menor resolució, que va permetre realitzar un seguiment longitudinal des del temps previ a l'operació (basal) fins a 28 dies després de la cirurgia. També es va emprar una seqüència de major resolució per detectar alteracions *ex vivo* en la mielina a temps basal i a temps final (2 mesos post-operació). Per acabar, es van avaluar les alteracions en l'expressió de la proteïna bàsica de mielina en el teixit per immunohistoquímica 2 mesos després d'induir hipoperfusió.

3.2.1. Alteracions en les fibres de mielina detectables per imatges de DTI

Es van avaluar canvis en la FA en ratolins C57Bl6 per determinar el grau d'integritat de les fibres de mielina. La Figura 107 mostra una reducció de la FA 28 dies després de la hipoperfusió en estructures com la càpsula interna ($p < 0.0001$) o la fímbria ($p < 0.0001$) en ratolins de 6 mesos a l'hemisferi dret. No obstant, també s'observa un augment de la FA a la comissura anterior, indicant una possible compensació subjacent. El nombre d'alteracions en la FA incrementa amb l'edat ja que estructures pobres en mielina com l'estriat o l'hipocamp es van començar a alterar als 18 mesos d'edat. En ratolins de 12 mesos, la FA es va reduir al cos callós ($p < 0.0001$), a la càpsula interna ($p < 0.0001$), a la càpsula externa ($p = 0.0021$) i a la fímbria ($p < 0.0001$) 28 dies després de la cirurgia. En canvi, en ratolins de 18 mesos, la FA es va reduir a totes les regions cerebrals estudiades excepte a la comissura anterior com s'ha esmentat anteriorment.

La FA també es va veure alterada a l'hemisferi esquerre i, tot i que els resultats de les dades de DTI *in vivo* no van mostrar diferències entre hemisferis, la FA es va reduir en totes les estructures estudiades, exceptuant subtils augments als 7 dies de la operació a la comissura anterior.

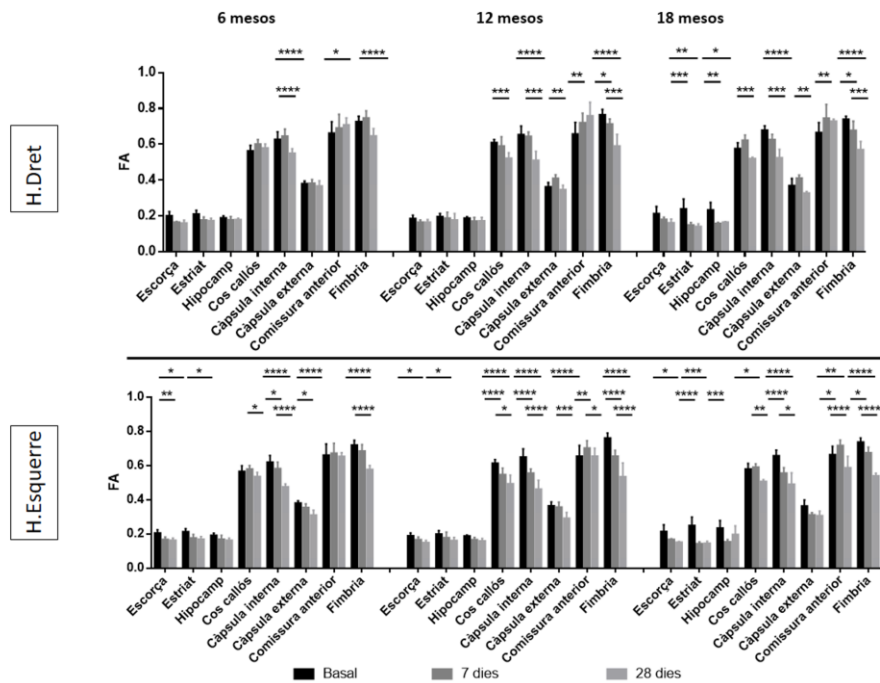


Figura 107. Efecte de la hipoperfusió per ACAS en ratolins C57Bl6 envellits. Es van utilitzar 13 ratolins de 6 mesos, 14 de 12 mesos i 5 de 18 mesos. Resultats expressats com a mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on * equival a una $p < 0.05$, ** a $p < 0.01$, *** a $p < 0.001$ i **** a $p < 0.0001$.

En el grup de ratolins ApoE^{-/-} la FA es va reduir en més estructures als 6 mesos d'edat com són l'escorça ($p=0.0220$), l'hipocamp ($p=0.0383$), la càpsula interna ($p=0.0013$) i la fimbria (0.0147), indicant més vulnerabilitat a la hipoperfusió a l'hemisferi dret que en el C57Bl6 (Figura 108). En ratolins ApoE^{-/-} es va reduir la FA a l'escorça ($p=0.0100$), la càpsula interna ($p < 0.0001$), la comissura anterior ($p=0.0005$) i la fimbria ($p < 0.0001$) amb l'envelliment en l'hemisferi esquerre. Novament, la FA no només es va reduir a les estructures esmentades de l'hemisferi dret sinó que l'hemisferi esquerre també va mostrar una reducció de la FA. Tot i això, s'observa que la reducció de la FA va ser més accentuada a l'hemisferi esquerre en ratolins ApoE^{-/-} en consonància a la leucoaraiosi asimètrica del model.

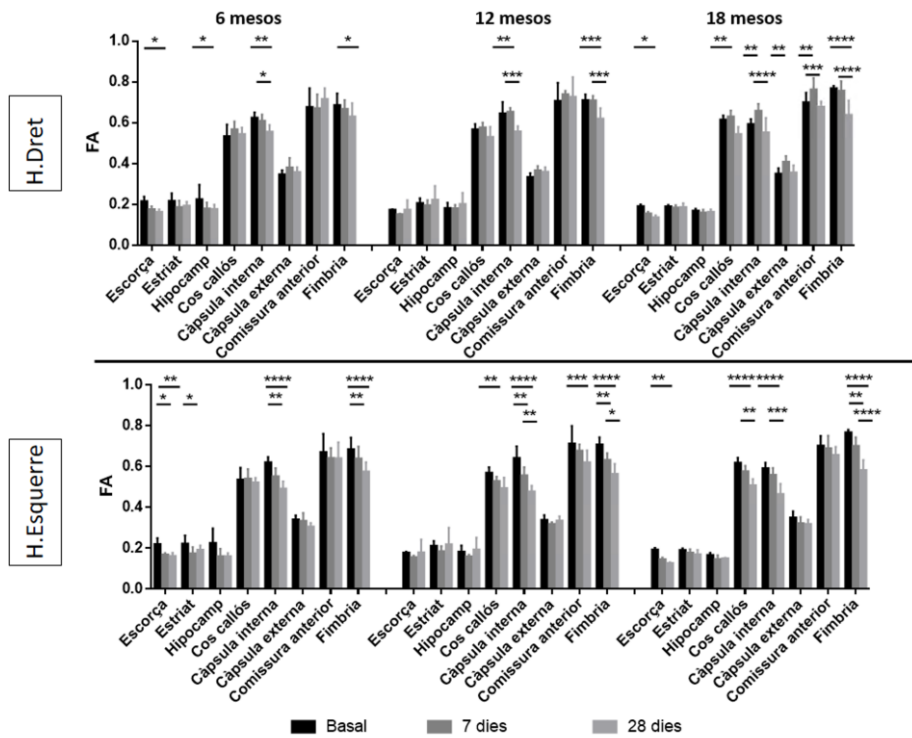


Figura 108. Efecte de la hipoperfusió per ACAS en ratolins ApoE^{-/-} envellits. Es van utilitzar 10 ratolins de 6 mesos, 6 de 12 mesos i 8 de 18 mesos. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on * equival a una p<0.05, ** a p<0.01, *** a p<0.001 i **** a p<0.0001.

Es van adquirir imatges de DTI d'alta resolució de mostres *ex vivo*. Es van utilitzar cervells abans de ser sotmesos a qualsevol cirurgia (basal) i es van aprofitar els que es van analitzar longitudinalment com a mostres finals (2 mesos post-operació). A diferència dels resultats de la FA de l'anàlisi de les imatges de DTI *in vivo*, la FA es va reduir entre l'estat basal i 2 mesos després de la cirurgia només a l'hemisferi esquerre en ratolins C57Bl6, tal i com s'observa a la Figura 109. A l'hemisferi esquerre la FA es va reduir a la comissura anterior, indicant que és una estructura resistent a la hipoperfusió fins als 2 mesos.

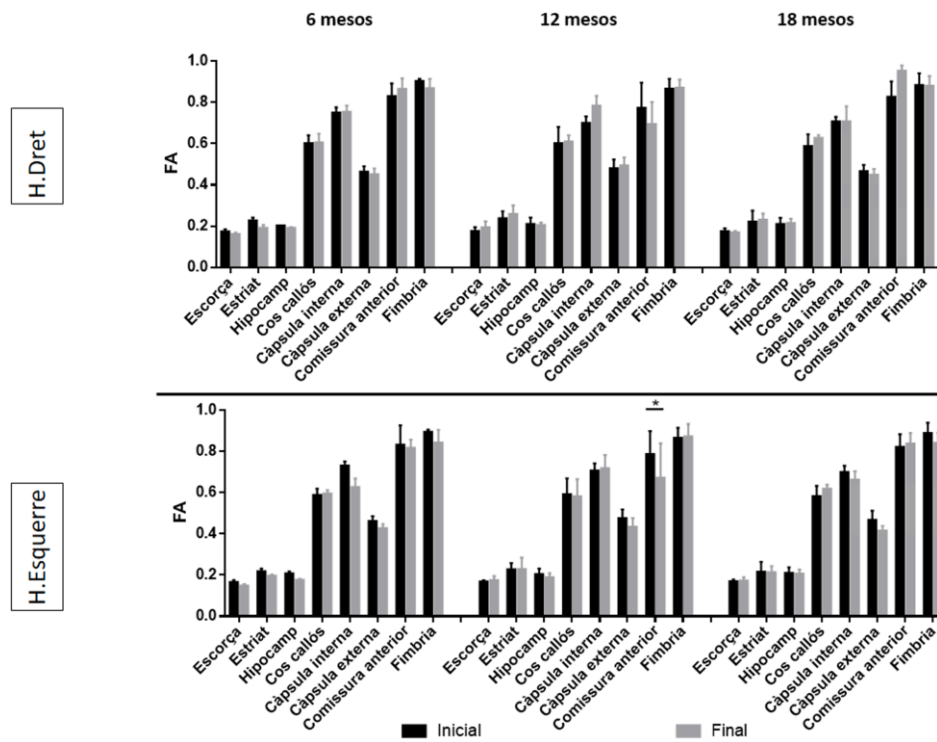


Figura 109. Efecte de la hipoperfusió ACAS sobre la FA *ex vivo* en ratolins C57Bl6. Es van utilitzar mostres en estat basal de 6 mesos (n=4), de 12 mesos (n=7) o de 18 mesos (n=3) i mostres 2 mesos després de la cirurgia de 6 mesos (n=3), de 12 mesos (n=3) i de 18 mesos (n=4). Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA, on * equival a una p<0.05.

En ratolins ApoE^{-/-}, en canvi, en l'anàlisi de les imatges de DTI *ex vivo* es van detectar reduccions de la FA en tots dos hemisferis, indicant que el ratolins ApoE^{-/-} són sensibles a la hipoperfusió independentment de l'hemisferi cosa que podria deure's a una menor capacitat de compensació. A la Figura 110 s'observa una reducció de la FA a la càpsula interna (p=0.0058) i a la fímbria (p=0.0069) a l'hemisferi dret. A l'hemisferi esquerre la FA es va reduir també a la càpsula interna (p=0.0049) i a la fímbria (p=0.0015).

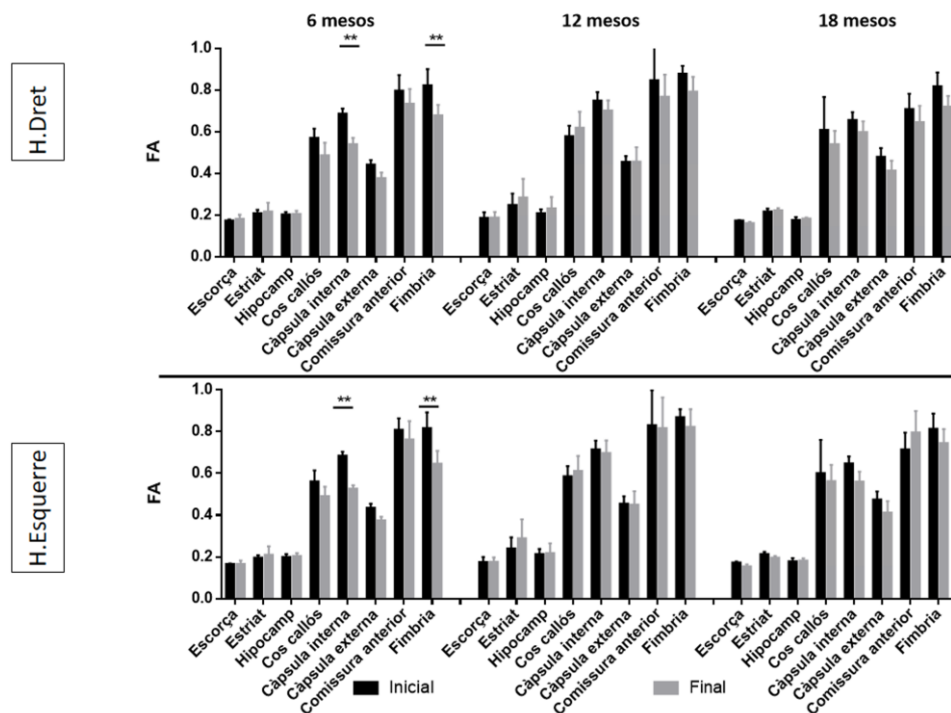


Figura 110. Efecte de la hipoperfusió ACAS sobre la FA *ex vivo* en ratolins ApoE^{-/-}. Es van utilitzar mostres en estat basal de 6 mesos (n=4), de 12 mesos (n=5) o de 18 mesos (n=3) i mostres 2 mesos després de la cirurgia de 6 mesos (n=6), de 12 mesos (n=6) i de 18 mesos (n=5). Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA, on ** equival a una p<0.01.

A la Figura 111 es mostren els resultats de l’anàlisi de la difusió mitjana en ratolins C57Bl6 envellits. La MD es va reduir en ratolins de 6 mesos al cos callós (p=0.0128), a la comissura anterior (p=0.0094) i a la fímbria (p=0.0247) a l’hemisferi dret. A l’hemisferi esquerre les mateixes estructures esmentades van presentar una reducció de la MD (p=0.0154; p=0.0311 i p=0.0016), indicant que les estructures esmentades són les més sensibles a la hipoperfusió per ACAS. No obstant, amb l’envelliment es va reduir la MD també a altres estructures com la càpsula interna (p=0.0374), la càpsula externa (0.0491), l’hipocamp (p=0.0150) o l’escorça (p=0.0079). La MD no es va comportar d’una forma diferent entre hemisferis.

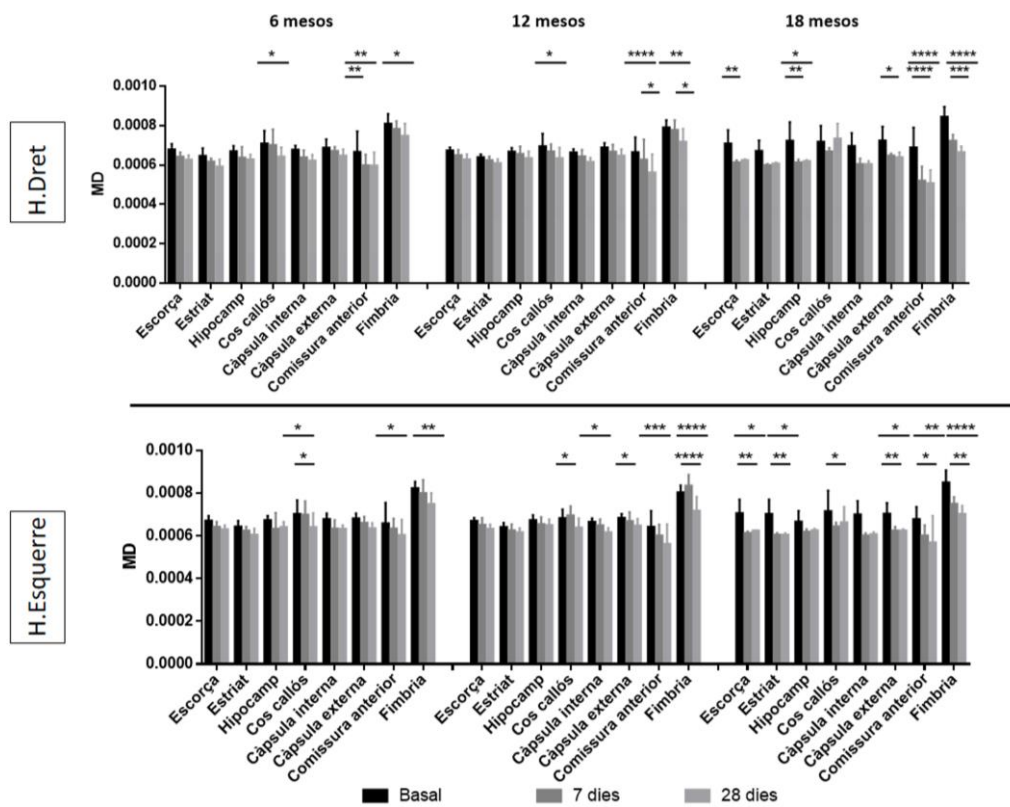


Figura 111. Efecte de la hipoperfusió ACAS sobre la difusivitat mitjana en ratolins C57Bl6 envellits. Es van utilitzar 13 ratolins de 6 mesos, 14 de 12 mesos i 5 de 18 mesos. Resultats expressats com a mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on * equival a una $p < 0.05$, ** a $p < 0.01$ i **** a $p < 0.0001$.

En ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos la MD es va reduir amb la hipoperfusió pràcticament en totes les estructures estudiades. A diferència dels ratolins C57Bl6, les alteracions de la MD no es van incrementar amb l'edat. Tot i que la MD es va reduir en ratolins ApoE^{-/-} en gaire bé totes les regions cerebrals, hi ha estructures com ara l'hipocamp on als 28 dies de la cirurgia es va produir un augment de la MD respecte els 7 dies post-operació (Figura 112).

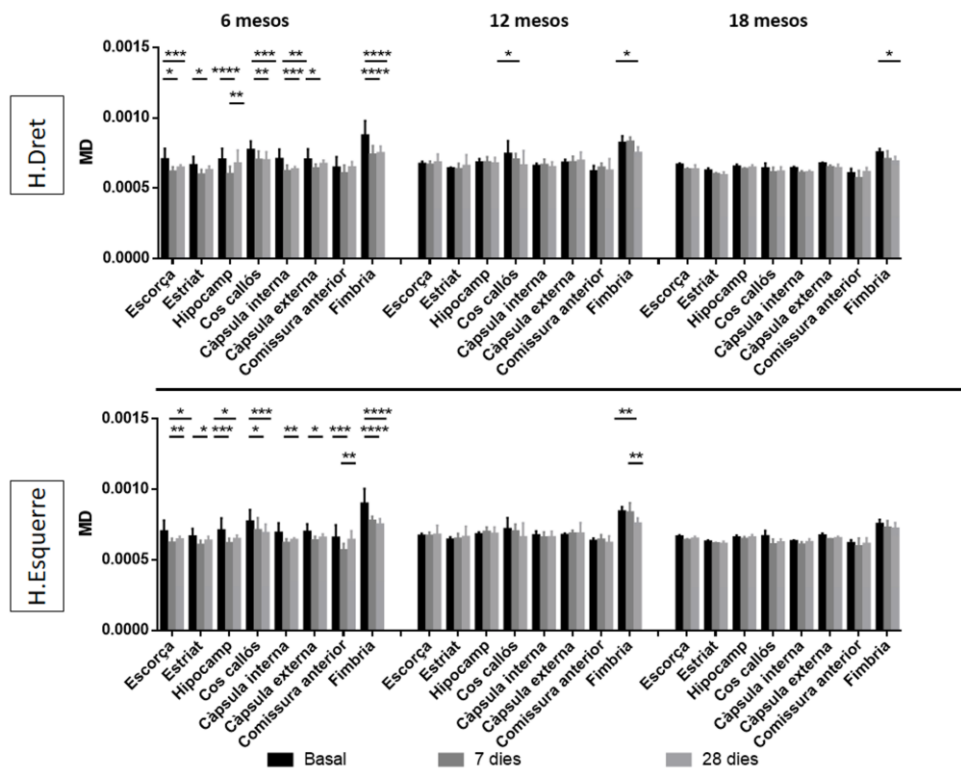


Figura 112. Efecte de la hipoperfusió per ACAS en ratolins ApoE^{-/-} envellits. Es van utilitzar 10 ratolins de 6 mesos, 6 de 12 mesos i 8 de 18 mesos. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on * equival a una p<0.05, ** a p<0.01, *** a p<0.001 i **** a p<0.0001.

A la Figura 113 es mostren els canvis en la MD *ex vivo* en ratolins C57Bl6. Els resultats de les imatges de DTI *ex vivo* en ratolins C57Bl6 van validar els resultats obtinguts *in vivo*. La MD es va reduir 2 mesos després de la hipoperfusió, malgrat l'anàlisi post hoc no va mostrar diferències significatives en cap regió, la hipoperfusió va produir una reducció significativa de la MD en els dos hemisferis (p<0.0001).

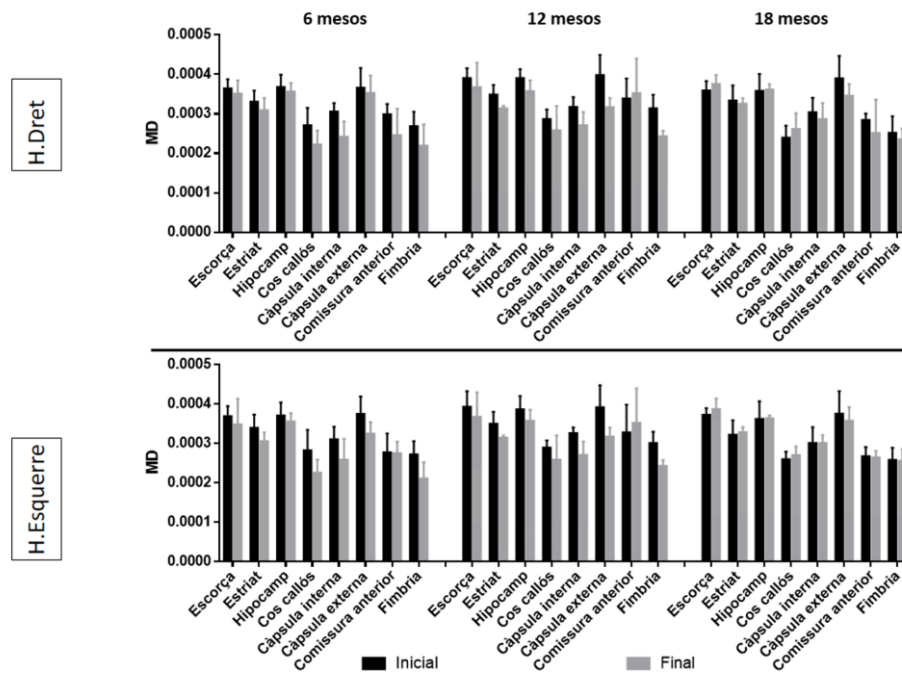


Figura 113. Efecte de la hipoperfusió ACAS sobre la MD *ex vivo* en ratolins C57Bl6. Es van utilitzar mostres en estat basal de 6 mesos (n=4), de 12 mesos (n=7) o de 18 mesos (n=3) i mostres 2 mesos després de la cirurgia de 6 mesos (n=3), de 12 mesos (n=3) i de 18 mesos (n=4). Resultats expressats com a mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA.

L'anàlisi *ex vivo* de les imatges de DTI en ratolins ApoE^{-/-} va validar el resultats obtinguts *in vivo*. S'ha esmentat anteriorment que en ratolins ApoE^{-/-} es produïa un augment de la MD als 28 dies de la hipoperfusió. En els resultats *ex vivo* va augmentar a la commissura anterior en ratolins de 6 mesos (p=0.0073) i en ratolins de 12 mesos (p=0.0412), tal i com s'observa a la Figura 114.

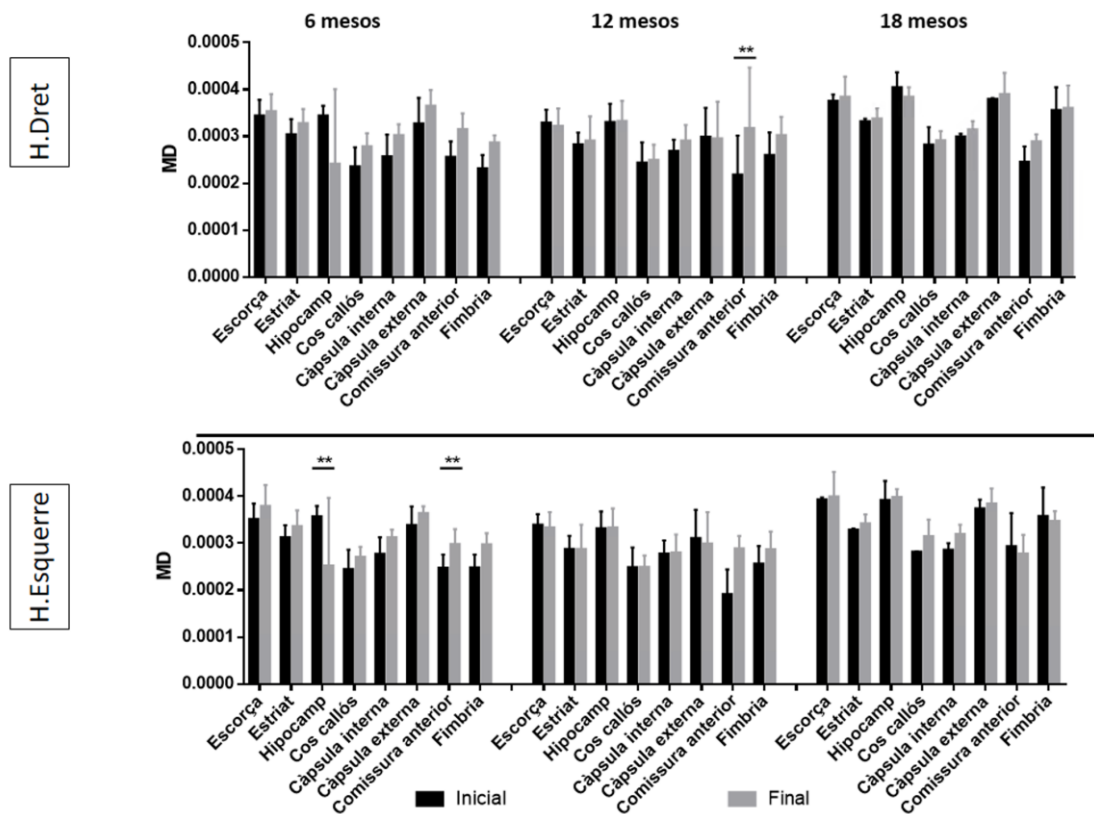


Figura 114. Efecte de la hipoperfusió ACAS sobre la MD *ex vivo* en ratolins ApoE^{-/-}. Es van utilitzar mostres en estat basal de 6 mesos (n=4), de 12 mesos (n=5) o de 18 mesos (n=3) i mostres 2 mesos després de la cirurgia de 6 mesos (n=6), de 12 mesos (n=6) i de 18 mesos (n=5). Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA, on ** equival a una p<0.01.

Els components vectorials de la difusivitat, axial o λ_1 i radial o λ_2 i λ_3 , van mostrar canvis en el mateix sentit que l’anàlisi dels factors principals (FA i MD), tot i que amb valors més heterogenis i amb una elevada variabilitat, en funció de les diferents estructures analitzades (dades no mostrades).

Analitzant tots els resultats en conjunt, es podria dir que la FA disminueix com a conseqüència de la hipoperfusió crònica en totes dues soques, d’una manera més marcada en les adquisicions *in vivo*, i aquestes diferències es veuen reduïdes en les mostres *ex vivo*, tot i que es manté la tendència, o fins i tot la diferència estadísticament significativa en algunes de les estructures analitzades, principalment aquelles riques en contingut de mielina. D’altra banda, contràriament al que era d’esperar, la MD va mostrar una caiguda significativa en les adquisicions *in vivo*. Aquesta davallada deixava de ser significativa en les mostres *ex vivo* dels ratolins C57Bl6 i es revertia totalment en els ratolins ApoE^{-/-}. La caiguda de MD en les mostres *in vivo* podria estar influenciada per

canvis en la compartimentalització de l'aigua en els cervells dels ratolins operats, o a canvis en la densitat cel·lular deguts a un increment en la reactivitat glial post-cirurgia.

Immunotincions per Iba1 (marcador de micròglia) i GFAP (marcador d'astròcit), van mostrar una reacció de la micròglia i dels astròcits 2 mesos després de la hipoperfusió. La Figura 115 il·lustra a mode d'exemple la reacció microglial en 3 animals C57Bl6 i 3 animals ApoE^{-/-} de 18 mesos, on podem observar una heterogeneïtat del marcatge. Alguns animals mostraven increment de la reactivitat microglial en algunes estructures com ara el cós callós (caps de fletxa blancs).

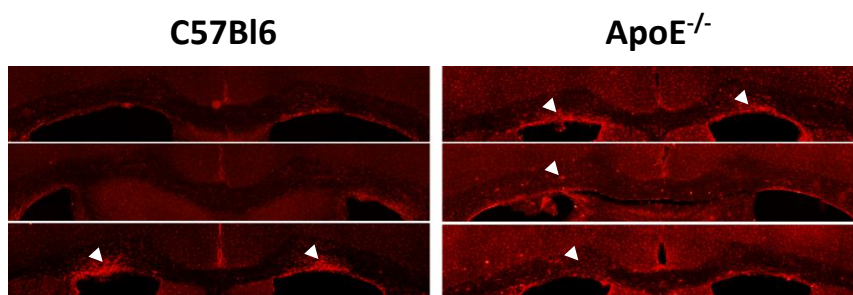


Figura 115. Immunotinció amb Iba1 en 3 animals C57Bl6 i 3 animals ApoE^{-/-} de 18 mesos, dos mesos després d'hipoperfusió crònica per ACAS.

La reacció astrogliàl es va veure també en alguns animals, sobretot en el cos callós (Fig. 116). De la mateixa manera que amb la micròglia, es va veure una expressió més intensa de GFAP de manera difusa per tot el cervell, principalment en els ApoE^{-/-}.

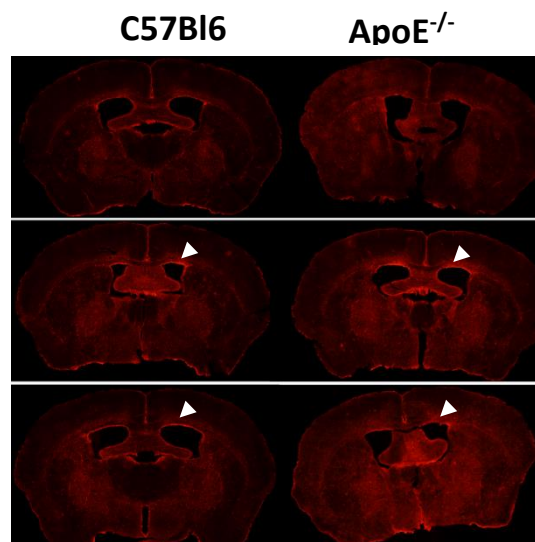


Figura 116. Expressió de GFAP en els mateixos animals que la Figura 115. Caps de fletxa blancs indiquen zones del cós callós on hi ha un marcat increment de l'expressió de GFAP. La intensitat de marcatge també és lleugerament major en els ratolins ApoE^{-/-}, indicant una major reacció astrocitària de manera difusa a tot el cervell.

3.2.2. Alteracions en les fibres de mielina a nivell histopatològic

Es van avaluar els canvis en la expressió de MBP produïts per la hipoperfusió en ratolins C57Bl6 i es va detectar una reducció d'aquesta en totes les regions estudiades en ratolins de 6 i 12 mesos ($p < 0.0001$), tal i com es mostra a la Figura 117. En canvi, en ratolins de 18 mesos no es van trobar diferències significatives, possiblement perquè els valors inicials ja eren molt baixos, indicant que les diferències tendeixen a igualar-se amb l'edat. No es van detectar diferències entre hemisferis.

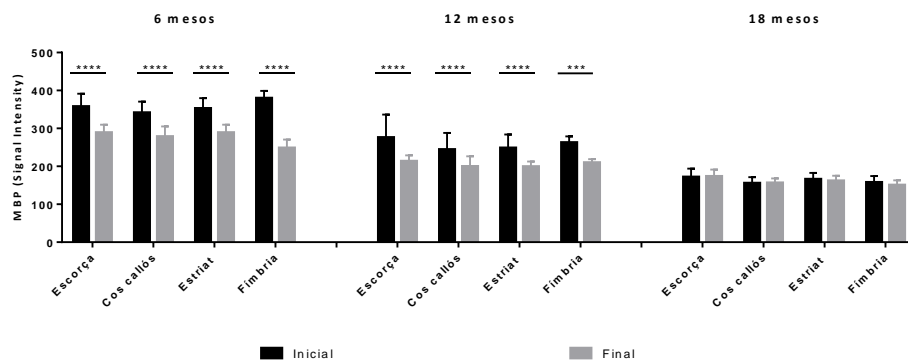


Figura 117. Efecte de la hipoperfusió sobre la expressió de MBP a l'escorça, el cos callós, l'estriat, el tàlem i la fimbria en ratolins C57Bl6. Es van utilitzar 4 mostres inicials de 6 mesos, 4 de 12 mesos i 6 de 18 mesos; i mostres finals (2 mesos post-cirurgia) de 6 mesos ($n=7$), de 12 mesos ($n=7$) i de 18 mesos ($n=7$). Resultats expressats com a mitjana \pm DE i analitzats amb Two-way ANOVA, post hoc Bonferroni on *** $p < 0.001$ i **** $p < 0.0001$.

En ratolins ApoE^{-/-} de 6 i 12 mesos es va produir una reducció de la expressió de MBP amb la hipoperfusió a totes les estructures estudiades excepte a la fimbria ($p > 0.999$), tal i com es mostra a la Figura 118. No obstant, en ratolins de 18 mesos no es van detectar diferències significatives en la expressió del MBP, exceptuant a l'estriat ($p = 0.0218$), indicant novament que les diferències tendeixen a igualar-se amb l'edat.

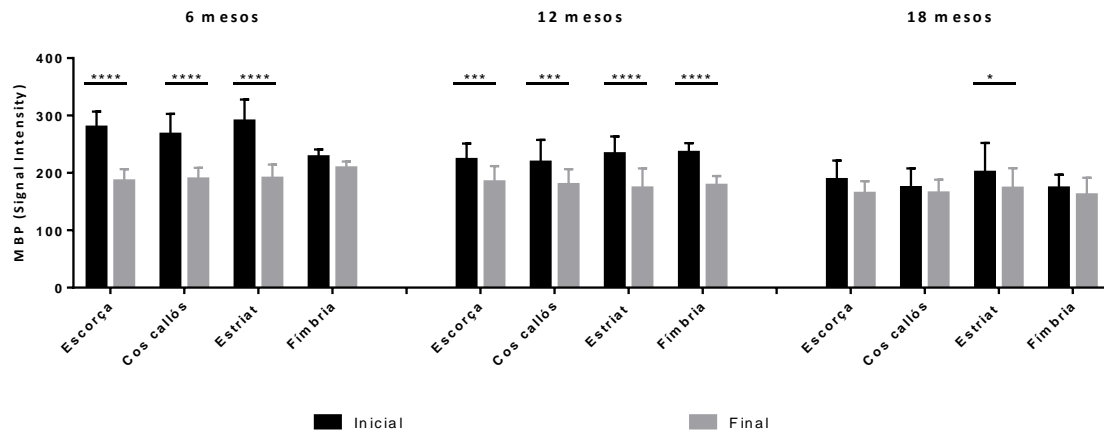


Figura 118. Efecte de la hipoperfusió sobre la expressió de MBP a l'escorça, el cos callós, l'estriat, el tàlem i la fimbria en ratolins ApoE^{-/-}. Es van utilitzar 12 mostres inicials de 6 mesos, 10 de 12 mesos i 8 de 18 mesos i mostres finals (2 mesos post-cirurgia) de 6 mesos (n=11), de 12 mesos (n=7) i de 18 mesos (n=9). Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb Two-way ANOVA, post hoc Bonferroni on * p<0.05, *** p<0.001 i **** p<0.0001.

Es van comparar les dades finals de la senyal de MBP entre ratolins C57Bl6 i ratolins ApoE^{-/-}, tal i com s'observa a la Figura 119. Es va trobar menys senyal de MBP en els ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos a l'escorça (p<0.0001), al cos callós (p<0.0001), a l'estriat (p<0.0001) i a la fimbria (p=0.0277). Els ratolins de 12 mesos van presentar una reducció del senyal de MBP a l'escorça (p=0.0006), al cos callós (p=0.0377), a l'estriat (p=0.0034) i a la fimbria (p=0.0081). Per últim, en ratolins de 18 mesos no es van detectar diferències significatives en el senyal de MBP entre ratolins C57Bl6 i ratolins ApoE^{-/-}. Aquests resultats indiquen que les diferències en el senyal en MBP finals per soca que es troben en ratolins de 6 i de 12 mesos, s'acaben equiparan amb l'edat.

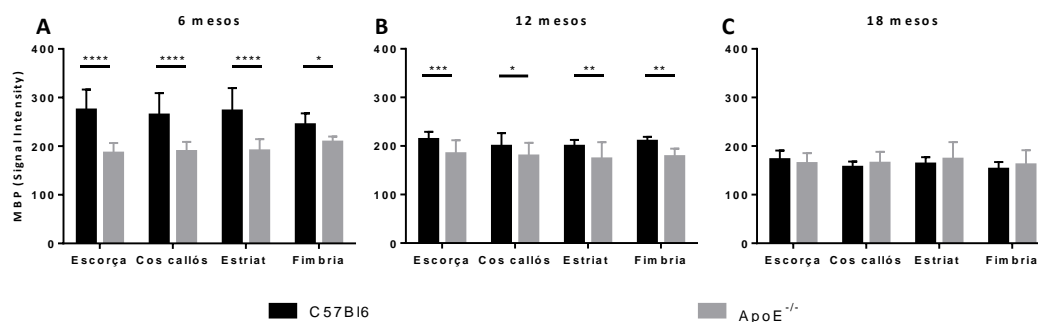


Figura 119. Efecte de la hipoperfusió per soques 2 mesos després de la operació ACAS. **A)** En ratolins de 6 mesos. Es van utilitzar 7 ratolins C57Bl6 i 11 ApoE^{-/-} **B)** En ratolins de 12 mesos. Es van utilitzar 7 ratolins C57Bl6 i 7 ApoE^{-/-}. **C)** En ratolins de 18 mesos. Es van utilitzar 7 ratolins C57Bl6 i 9 ApoE^{-/-}. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb Two-way ANOVA, post hoc Bonferroni on * equival a p<0.05, ** a p<0.01, *** a p<0.001 i **** a p<0.0001.

3.3.ALTERACIONS A LA SUBSTÀNCIA GRISA

Els canvis en la perfusió del cervell, i més concretament la hipoperfusió, poden provocar alteracions transitòries o permanents en l'intercanvi de nutrients i gasos, necessari pel correcte funcionament cerebral. Les disruptions de la perfusió poden provocar una pèrdua progressiva de neurones, que pateixen especialment la manca d'oxigen i glucosa, de manera important a nivell de l'escorça, com s'ha reportat en altres patologies com ara la malaltia d'Alzheimer.

S'ha descrit que la hipoperfusió regional s'associa a una reducció del gruix cortical en pacients asimptomàtics amb estenosi carotídia. Tenint en compte això, i les alteracions del gruix cortical que prèviament s'han descrit en l'envelliment, en les dues soques dels experiments de la present tesi doctoral, és esperable que el gruix cortical es vegi afectat pel model experimental d'hipoperfusió crònica.

A la Figura 120 es mostren els resultats de l'anàlisi del gruix cortical en ratolins C57Bl6 a les tres edats d'estudi. Els ratolins de 6 mesos no van mostrar cap diferència en els diferents temps estudiats després d'induir hipoperfusió, i tampoc van mostrar cap diferència entre hemisferis ($p=0.2744$). En ratolins de 12 mesos, es va trobar una reducció del gruix cortical d'ambdós hemisferis als dos mesos de la operació ($p=0.0036$), sense mostrar diferències entre hemisferis ($p=0.6803$). Es va trobar una reducció asimètrica del gruix cortical en animals de 18 mesos ($p=0.0392$), sent l'hemisferi dret el que decreix més a partir dels 28 dies de la operació, coincidint amb la oclusió de l'anell ameroïde, que s'ha reportat entre els 14 i 21 dies després de l'operació (Figura 120C).

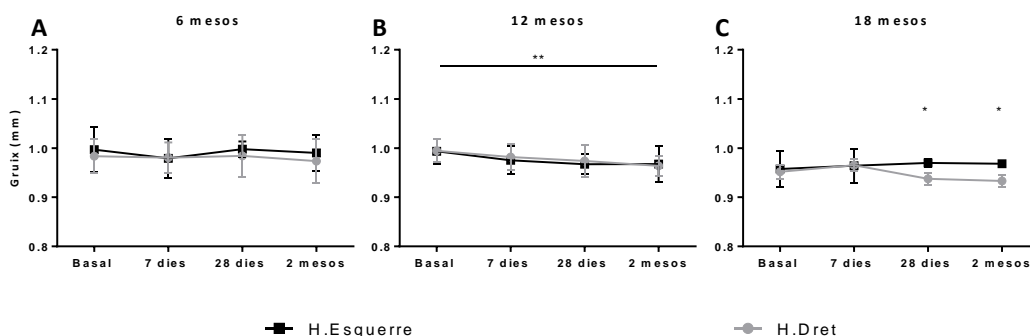


Figura 120. Efecte de la hipoperfusió sobre el gruix cortical en ratolins C57Bl6. **A)** Gruix cortical en ratolins de 6 mesos. **B)** Gruix cortical en ratolins de 12 mesos. **C)** Gruix cortical en animals de 18 mesos. Resultats expressats coma mitjana

± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on * s'associa a una $p < 0.05$. Es van utilitzar 15 ratolins de 6 mesos, 16 de 12 mesos i 6 de 18 mesos.

De la mateixa manera es va analitzar el gruix cortical dels ratolins ApoE^{-/-} (Figura 121). Els animals de 6 mesos es comporten de la mateixa manera que els ratolins C57Bl6. Tot i que el grup de 12 mesos mostra una tendència a disminuir el gruix cortical, aquesta diferència no arriba a ser significativa ($p = 0.1748$). En canvi, el grup de 18 mesos sí va mostrar diferències en el gruix cortical al llarg dels dos mesos posteriors a l'operació ($p = 0.0024$). Pel que fa a la comparativa entre hemisferis, només es va trobar diferències en el grup de 18 mesos, essent significativa a dia 28 ($p = 0.0004$), tot i que aquesta diferència no es va conservar a temps final, on es va detectar un brusc decreixement també en l'hemisferi esquerre (Figura 121C).

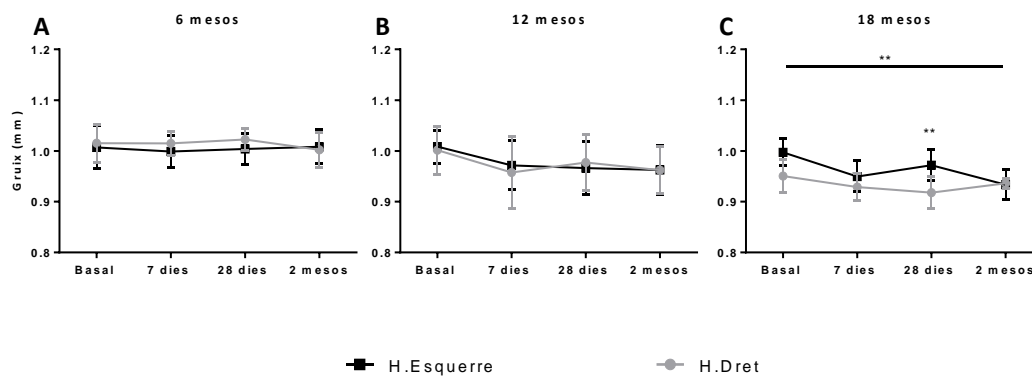


Figura 121. Efecte de la hipoperfusió sobre el gruix cortical en ratolins ApoE^{-/-}. **A)** Gruix cortical en ratolins de 6 mesos. **B)** Gruix cortical en ratolins de 12 mesos. **C)** Gruix cortical en animals de 18 mesos. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on * s'associa a una $p < 0.05$. Es van utilitzar 13 ratolins de 6 mesos, 9 de 12 mesos i 11 de 18 mesos.

Com ja s'ha esmentat en apartats anteriors, el gruix cortical pot ser diferent en funció del gènere, sobretot en edats més joves, i això pot influir en la resposta a la hipoperfusió. Per això es va analitzar de manera comparativa els valors de gruix cortical de mascles i femelles, representats a la Figura 122. En els dos hemisferis es mantenia la tendència a la reducció del gruix cortical. En les edats més joves (6 i 12 mesos) les femelles parteixen d'un gruix cortical inicial major, i es mantenen aquestes diferències al llarg del temps d'hipoperfusió. Com ja s'havia descrit en apartats anteriors, a edats més envellides desapareixen les diferències de gènere, detectant-se una tendència a la reducció del gruix cortical, que va ser significativa pel que fa a l'hemisferi esquerre ($p = 0.0042$).

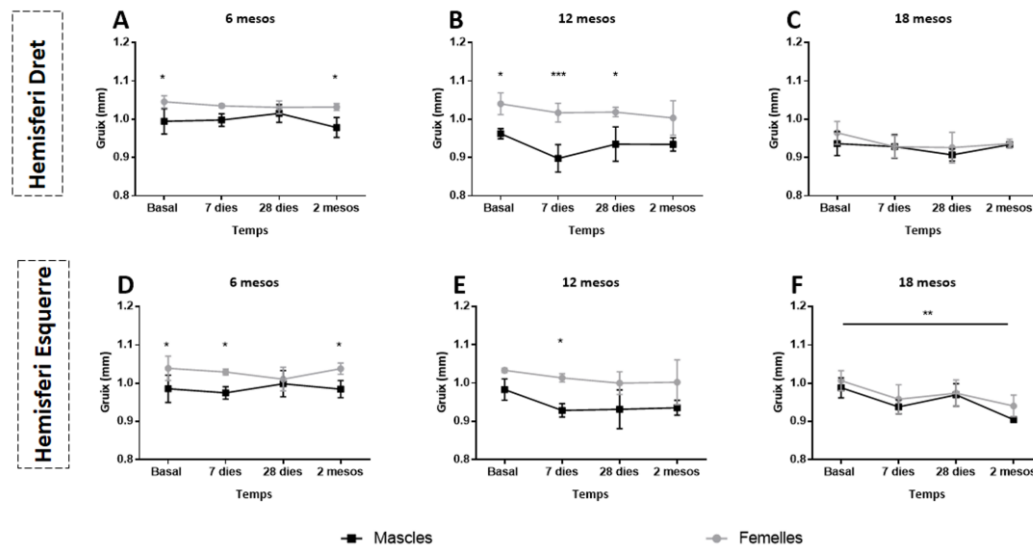


Figura 122. Efecte de la hipoperfusió en el gruix cortical d'animals ApoE^{-/-} agrupats per gènere. Alteracions del gruix cortical a l'hemisferi dret en ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (A), de 12 mesos (B) i de 18 mesos (C). Alteracions del gruix cortical a l'hemisferi esquerre en ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (D), de 12 mesos (E) i de 18 mesos (F). Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on * s'associa a una p<0.05 i *** a una p<0.001. Es van utilitzar 13 ratolins de 6 mesos, 9 de 12 mesos i 11 de 18 mesos.

3.4.ALTERACIONS CONDUCTUALS

Les alteracions poden aparèixer com a conseqüència dels canvis vasculars que es produeixen amb l'envelliment, factors de risc o amb la presència de patologies cròniques. Tal i com s'ha explicat a la introducció, els tests d'avaluació neuropsicològica segueixen sent una de les eines més útils per al diagnòstic de demència. Es van utilitzar tests de comportament per extreure informació d'afectació neurològica, concretament en relació a canvis en la coordinació motora, la força muscular, la capacitat exploratòria, l'ansietat i la memòria a curt termini.

3.4.1. Coordinació motora

S'ha descrit que la coordinació motora pot veure's afectada per la hipoperfusió, reduint-se així, el temps de latència a caure del rotarod. Es van analitzar les dades del test rotarod i no es van trobar canvis en el temps de latència degut a la hipoperfusió ni en ratolins C57Bl6 (p=0.0887) ni en els ApoE^{-/-} (p=0.4784) al llarg dels dos mesos posteriors a l'operació (Figura 123). En els ratolins ApoE^{-/-} es va produir una reducció de la coordinació amb l'envelliment en estat basal, com ja s'ha esmentat al segon apartat

de resultats ($p < 0.0001$), tendència que es va mantenir en els diferents temps post-operació, essent significativa a dia 7 ($p < 0.0001$), tal i com s'indica a la Figura 123B.

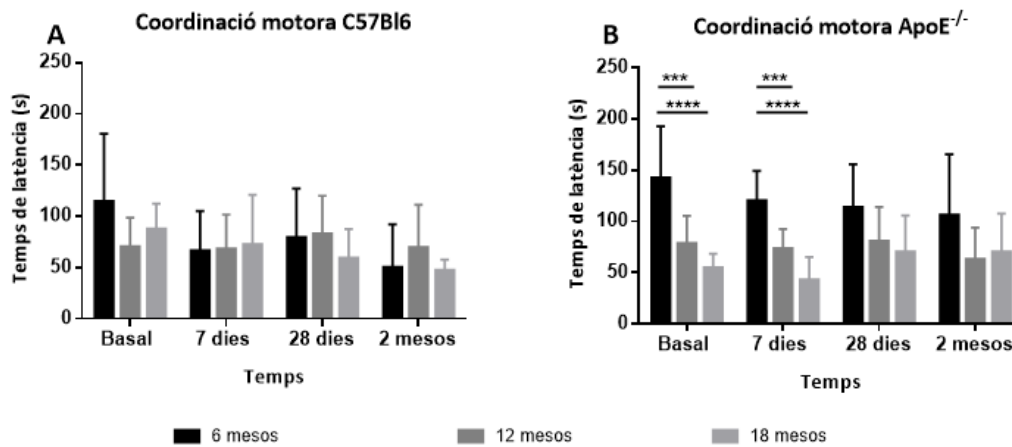


Figura 123. Efecte de la hipoperfusió sobre la coordinació motora. **A)** Coordinació motora en ratolins C57Bl6. **B)** Coordinació motora en ratolins ApoE^{-/-}. Resultats expressats com mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on *** s'associa a una $p < 0.001$ i **** a una $p < 0.001$. Es van utilitzar ratolins C57Bl6 de 6 mesos ($n=8$), de 12 mesos ($n=8$) i de 18 mesos ($n=8$) i 6 ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos, 13 de 12 mesos i 9 de 18 mesos.

La comparativa entre les dues soques al llarg del temps i no va detectar diferències significatives degudes a la hipoperfusió, tal i com s'observa a la Figura 124.

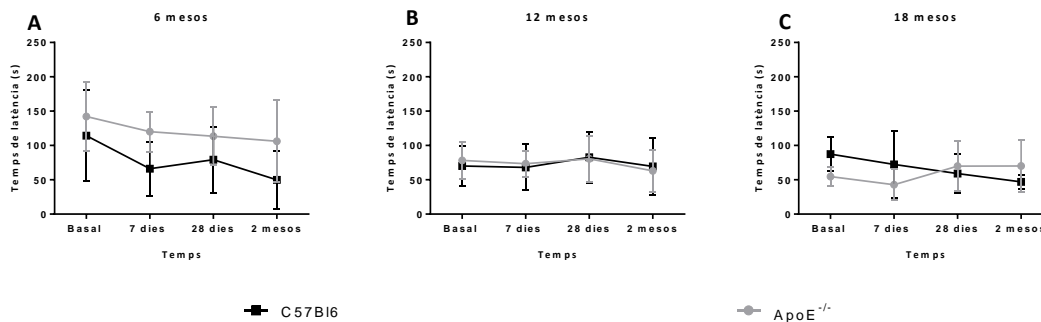


Figura 124. Efecte de la hipoperfusió sobre la coordinació motora per soques. **A)** Animals de 6 mesos. **B)** Ratolins de 12 mesos. **C)** Animals de 18 mesos. Resultats expressats com mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA. Es van utilitzar ratolins C57Bl6 de 6 mesos ($n=8$), de 12 mesos ($n=8$) i de 18 mesos ($n=8$) i 6 ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos, 13 de 12 mesos i 9 de 18 mesos.

3.4.2. Força muscular

S'ha descrit que la força muscular pot veure's afectada per la hipoperfusió, motiu pel qual es van analitzar les dades del test grip. En primer lloc es van avaluar possibles canvis en la força muscular per hipoperfusió combinada amb l'envelliment en cada soca i, en segon lloc, es van avaluar possibles canvis en la força muscular amb la hipoperfusió per soca.

La Figura 125 recull les dades de la força muscular combinant l'envelliment amb la hipoperfusió. L'anàlisi dels resultats va mostrar una reducció de la força muscular amb la hipoperfusió en totes dues soques. A més, la força muscular es va reduir amb l'envelliment, tal i com s'han explicat anteriorment. A la Figura 125A es mostra la reducció de la força muscular que va produir l'envelliment en ratolins C57Bl6 i a la 125B en ratolins ApoE^{-/-}. A part de que la força muscular es redueix amb la hipoperfusió i l'envelliment, després d'induir hipoperfusió els animals C57Bl6 de 6 mesos continuen preservant la seva força respecte a la resta d'edats d'estudi als 7 dies post-cirurgia (p=0.0237) i als 2 mesos (p=0.0324).

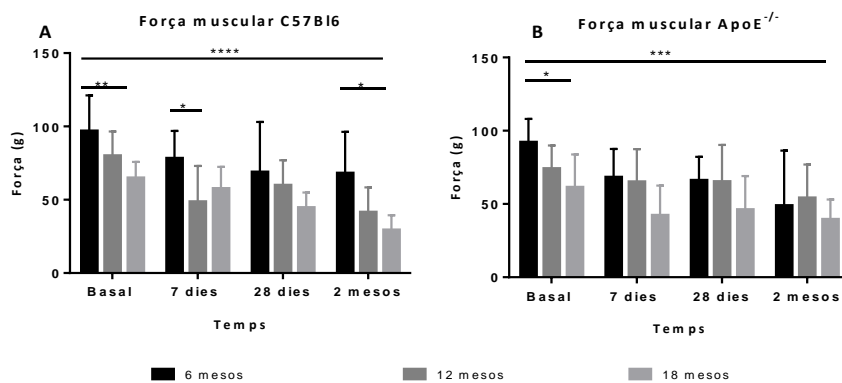


Figura 125. Efecte de la hipoperfusió i l'envelliment sobre la força muscular. **A)** Força muscular en ratolins C57Bl6. **B)** Força muscular en ratolins ApoE^{-/-}. Resultats expressats coma mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on * s'associa a p<0.05, ** a p<0.01, *** a p<0.001 i **** a p<0.0001. Es van utilitzar ratolins C57Bl6 de 6 mesos (n=8), de 12 mesos (n=8) i de 18 mesos (n=8) i ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=6), de 12 mesos (n=13) i de 18 mesos (n=9).

A la Figura 126 es recullen els canvis de la força muscular amb la hipoperfusió per soques. L'anàlisi dels resultats va mostrar una reducció de la força muscular amb la hipoperfusió a totes les edats de l'estudi, sense detectar diferències entre soques, indicant que la força muscular és un bon biomarcador de la hipoperfusió en ratolins.

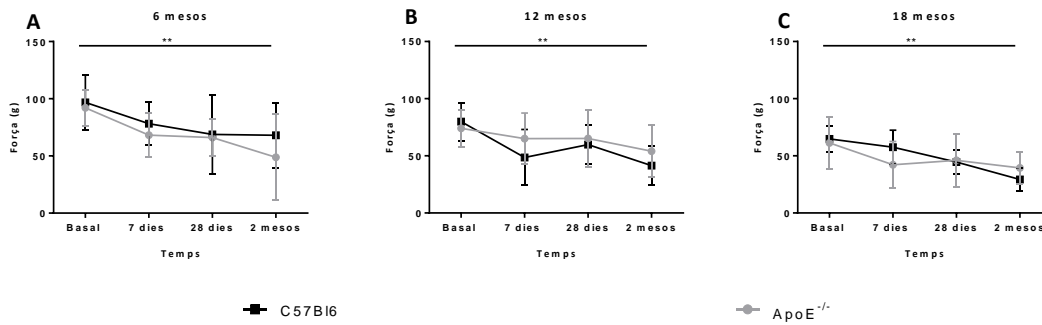


Figura 126. Efecte de la hipoperfusió sobre la força muscular per soques. **A)** Animals de 6 mesos. **B)** Ratolins de 12 mesos. **C)** Animals de 18 mesos. Resultats expressats com a mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on ** s'associa a $p < 0.01$. Es van utilitzar ratolins C57Bl6 de 6 mesos ($n=8$), de 12 mesos ($n=8$) i de 18 mesos ($n=8$) i 6 ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos, 13 de 12 mesos i 9 de 18 mesos.

3.4.3. Capacitat exploratòria

La capacitat exploratòria es va mesurar longitudinalment mitjançant el test de camp obert ja que s'ha descrit que es pot alterar amb la hipoperfusió. Es van avaluar tres paràmetres utilitzant aquest test, dos paràmetres motors, que són la distància recorreguda i la velocitat i, un paràmetre de caire neuropsicològic com és el temps de permanència al quadrant central del camp obert, com a mesura de l'ansietat.

A la Figura 127 es mostren els resultats dels canvis en la distància recorreguda atribuïbles a la combinació de la hipoperfusió i l'envelliment. No es va detectar cap canvi en la distància recorreguda ni en C57Bl6 ni en ApoE^{-/-} deguda a la hipoperfusió. Es va trobar una reducció de la distància recorreguda degut a l'envelliment en ratolins C57Bl6 ($p=0.0005$), essent estadísticament significativa als 28 dies de la intervenció, tal i com s'observa a la Figura 127A. Aquesta reducció de la distància recorreguda no es va trobar en els ApoE^{-/-} ($p=0.2590$), probablement degut a que la distància recorreguda inicial ja era molt petita (Figura 127B).

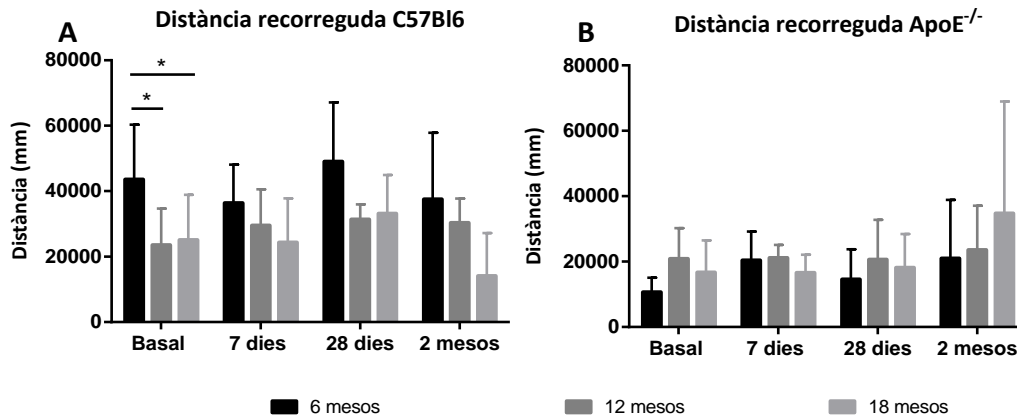


Figura 127. Efecte de la hipoperfusió i l'envelliment sobre la distància recorreguda. **A)** Distància recorreguda en ratolins C57Bl6. **B)** Distància recorreguda en ratolins ApoE^{-/-}. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA. Es van utilitzar ratolins C57Bl6 de 6 mesos (n=8), de 12 mesos (n=8) i de 18 mesos (n=8) i ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=6), de 12 mesos (n=13) i de 18 mesos (n=9).

La Figura 128 mostra una comparativa entre soques on s'indiquen els canvis deguts a la hipoperfusió en la distància recorreguda. L'anàlisi de les dades va mostrar que els C57Bl6 i els ApoE^{-/-} de 6 (p=0.0002) i 12 (p=0.0045) mesos es van comportar de manera diferent. El ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos van recórrer menys distància que els C57Bl6, sent als 28 dies post-cirurgia quan s'inicien aquests canvis (Figura 128A).

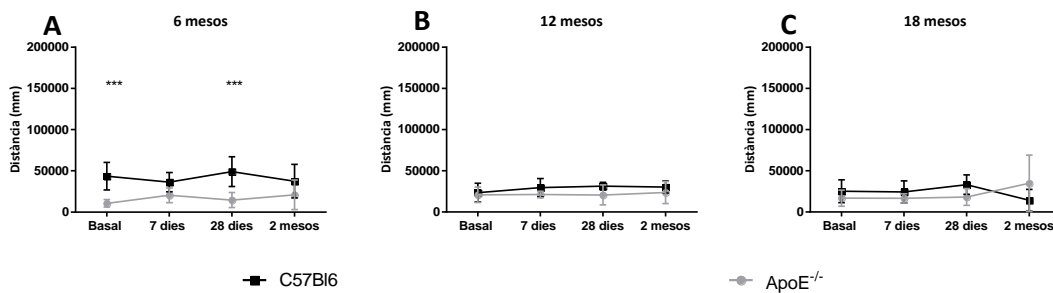


Figura 128. Efecte de la hipoperfusió sobre la distància recorreguda per soques. **A)** Animals de 6 mesos. **B)** Ratolins de 12 mesos. **C)** Animals de 18 mesos. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on ** s'associa a p<0.01. Es van utilitzar ratolins C57Bl6 de 6 mesos (n=8), de 12 mesos (n=8) i de 18 mesos (n=8) i 6 ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos, 13 de 12 mesos i 9 de 18 mesos.

A la Figura 129 es troben els resultats de l'anàlisi de l'efecte de la hipoperfusió i l'envelliment sobre la velocitat. L'anàlisi dels resultats va mostrar una reducció de la velocitat en ratolins C57Bl6 amb l'envelliment 2 mesos (p=0.0205) després de la cirurgia ACAS (Figura 129A). En canvi, en els ratolins ApoE^{-/-} no es van detectar canvis amb l'envelliment (p=0.5979), però es van detectar canvis amb la hipoperfusió (p=0.0471), tal i com s'indica a la Figura 129B. La velocitat d'exploració en ratolins ApoE^{-/-} baixa en la fase aguda i es recupera a la fase crònica.

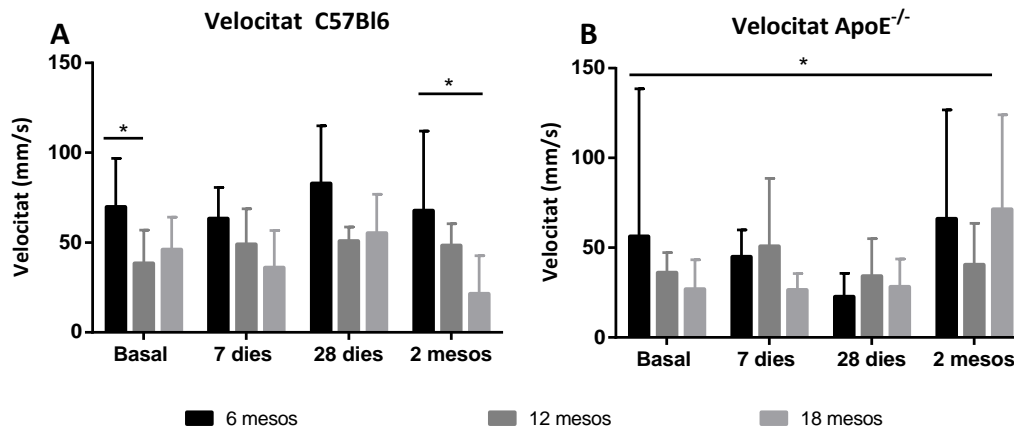


Figura 129. Efecte de la hipoperfusió i l'envelliment sobre la velocitat. **A)** Velocitat en ratolins C57Bl6. **B)** Velocitat en ratolins ApoE^{-/-}. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on * s'associa a p<0.05. Es van utilitzar ratolins C57Bl6 de 6 mesos (n=8), de 12 mesos (n=8) i de 18 mesos (n=8) i ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos (n=6), de 12 mesos (n=13) i de 18 mesos (n=9).

Per un altre costat, es van avaluar canvis en la velocitat amb la hipoperfusió per soques, tal i com s'observa a la Figura 130. L'anàlisi dels resultats no va mostrar diferències significatives atribuïbles a la hipoperfusió. No obstant, es van poder detectar diferències significatives entre C57Bl6 i ApoE^{-/-} de 6 mesos (p=0.0157), que s'inicien als 28 dies post-cirurgia (Figura 130A).

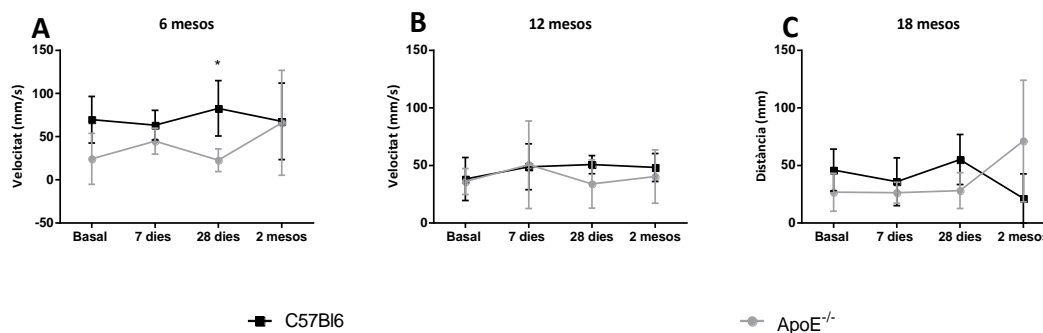


Figura 130. Efecte de la hipoperfusió sobre la velocitat per soques. **A)** Animals de 6 mesos. **B)** Ratolins de 12 mesos. **C)** Animals de 18 mesos. Resultats expressats com a mitjana ± DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on * s'associa a p<0.05. Es van utilitzar ratolins C57Bl6 de 6 mesos (n=8), de 12 mesos (n=8) i de 18 mesos (n=8) i 6 ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos, 13 de 12 mesos i 9 de 18 mesos.

Tal i com s'ha esmentat anteriorment es van mesurar canvis en l'ansietat mesurant el temps relatiu (%) que passen els ratolins a la part més interna del camp obert. Els resultats de l'anàlisi d'ansietat en relació a la hipoperfusió per soques. No es van trobar diferències significatives en relació a la hipoperfusió, més que en animals de 12 mesos (p=0.0327) on es dona un increment del temps relatiu a la regió interior amb la hipoperfusió.

RESULTATS

L'anàlisi de l'ansietat per soques només va mostrar diferències significatives en ratolins de 6 mesos, indicant que des de l'inici el ratolins C57Bl6 tenen menys ansietat que els ApoE^{-/-} (p=0.0068). Aquestes diferències es van trobar també als 28 dies (0.0266) i als 2 mesos (p=0.0006) de la intervenció quirúrgica (Figura 131A). Per contra, no es van trobar en ratolins ni de 12 mesos ni de 18 mesos, indicant que aquestes diferències s'equiparen amb l'edat.

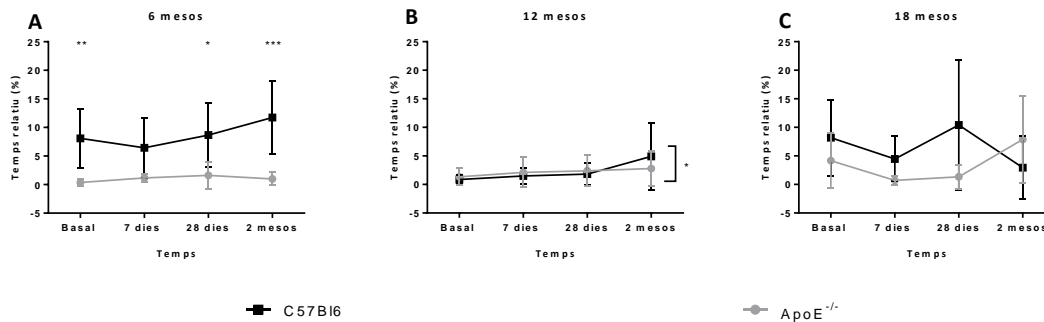


Figura 131. Efecte de la hipoperfusió sobre l'ansietat per soques. **A)** Animals de 6 mesos. **B)** Ratolins de 12 mesos. **C)** Animals de 18 mesos. Resultats expressats com a mitjana \pm DE i analitzats amb la prova Two-way ANOVA on * s'associa a $p < 0.05$, ** a $p < 0.01$ i *** a $p < 0.001$. Es van utilitzar ratolins C57Bl6 de 6 mesos (n=8), de 12 mesos (n=8) i de 18 mesos (n=8) i 6 ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos, 13 de 12 mesos i 9 de 18 mesos.

3.4.4. Capacitat de reconeixement

S'ha descrit que la hipoperfusió produeix una alteració en la memòria de treball. Es van mesurar canvis en la memòria a curt termini (2 hores) en tots el grups del present treball. L'estudi de la memòria a curt termini es va iniciar als 7 dies post-cirurgia amb l'objectiu de detectar canvis associats a la hipoperfusió crònica, tot i això, no es van trobar diferències significatives en cap de les dues soques ni atribuïbles a la hipoperfusió, probablement com a conseqüència de la prova de conducta escollida en el present estudi.

Es van utilitzar tests de conducta amb la finalitat de correlacionar les alteracions que s'han detectat amb les dades d'imatge. Les alteracions vasculars detectades podrien explicar el desenvolupament d'alteracions a la substància blanca i en l'atrofia cortical, que podrien tenir conseqüències motores i cognitives. Conjuntament, totes aquestes alteracions sembla que s'iniciïn en edats joves en ratolins ApoE^{-/-} i condueixen a pensar que les alteracions cerebrals es podrien detectar mitjançant l'estudi d'alteracions en la marxa o en la potència muscular.

La hipoperfusió és considerada una de les causes més plausibles de la demència d'origen vascular. S'han descrit alteracions en la marxa, en la potència muscular i alteracions en la memòria en els models animals d'hipoperfusió. En el present estudi, es va atribuir a la hipoperfusió debilitat muscular, independentment de la soca. Tot i que no es van detectar alteracions en la marxa utilitzant la prova rotarod, es van detectar alteracions en la capacitat exploratòria. La distància recorreguda en el camp obert no va canviar amb la hipoperfusió. No obstant, en edats joves es va detectar menor capacitat exploratòria en ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos 28 dies després de la cirurgia ACAS, indicant un envelliment prematur degut a la deficiència d'apolipoproteïna E. A més, la velocitat de reconeixement es va reduir amb la hipoperfusió en ratolins ApoE^{-/-}, que a més presenten més ansietat amb la hipoperfusió. Per últim, els ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos presenten una reducció de la memòria de reconeixement amb la hipoperfusió. aquests resultats semblen confirmar l'envelliment prematur en ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos, que es correlacionen amb alteracions vasculars detectades per imatge.

DISCUSSIÓ

1. NECESSITAT DE NOUS BIOMARCADORS EN DV

En la present tesi doctoral s'han buscat biomarcadors per imatge no invasiva dels processos patològics que acompanyen al desenvolupament de la demència d'origen vascular. Ens hem centrat en una sèrie de paràmetres ja descrits, coneguts per veure's alterats en altres patologies relacionades. En primer lloc, s'ha descrit el comportament d'aquests marcadors enfront a diferents a diferents factors de risc, i posteriorment, s'han aplicat a un model experimental muri de demència vascular d'origen vascular, al que també s'han aplicat els mateixos factors de risc. D'aquesta manera, es pretén trobar biomarcadors que permetin diferenciar els processos patològics associats a la DV d'aquells que són associats a l'envelliment o a d'altres factors de risc com l'aterosclerosi.

L'organització mundial de la salut (WHO) i l'Institut Nacional de Salut dels Estats Units (NIH) defineixen el terme de biomarcador com "aquelles característiques biològiques, bioquímiques, antropomètriques, etc, objectivament mesurables, i capaces de d'identificar processos fisiològics o patològics, o bé una resposta farmacològica a una intervenció terapèutica" (WHO, 2001), és a dir, que permetin descriure els processos biològics i definir els canvis que esdevenen en qualsevol procés biològic, sigui normal o patològic.

En el present estudi de biomarcadors es va posar èmfasi en la detecció de canvis vasculars estructurals i funcionals associats als factors de risc relacionats amb la demència d'origen vascular, mitjançant diferents tècniques d'imatge per ressonància magnètica com a eina traslacional per realitzar controls epidemiològics en poblacions en risc de patir demència. Entre els paràmetres mesurats hi trobem: canvis en el flux sanguini, en la morfologia de les artèries que irriguen el cervell, la densitat microvascular, i les alteracions induïdes per la hipòxia, com són alteracions a la substància blanca, el gruix cortical i canvis conductuals.

La prevalença de la demència vascular augmenta exponencialment degut a l'envelliment de la població a nivell mundial (Kalaria RN, 2018). L'envelliment pot produir múltiples alteracions vasculars com la disfunció endotelial, pèrdua de flexibilitat arterial, canvis en la longitud dels vasos o en la densitat microvascular (Abdelkarim et al., 2019). Com a conseqüència d'aquestes alteracions, s'altera flux sanguini cerebral de

manera que es redueix la biodisponibilitat d'oxigen. Aquesta condició acaba generant un ambient hipòxic que propicia la neurodegeneració. Però els canvis de tipus degeneratiu associats a l'envelliment no són suficients, per sí sols, per al desenvolupament de la demència. Altres factors, com ara la diabetis, la hipertensió, malalties inflamatòries cròniques, o dislipèmies, entre d'altres, poden contribuir també al desenvolupament de la DV (Javanshiri K et al., 2018). A part, existeixen factors genètics de predisposició (Ikram MA et al., 2017) així com factors ambientals (obesitat, tabaquisme, alcoholisme, inactivitat física, entre d'altres) (Srinivasan V et al., 2016), que poden tenir importància en un percentatge dels casos de DV. Tot això fa pensar que la demència d'origen vascular s'ha d'entendre com una patologia d'origen multifactorial.

El model animal escollit per reproduir la hipoperfusió crònica va ser l'estenosi bilateral asimètrica progressiva de les artèries caròtides en ratolí. La majoria de treballs anteriors a la literatura científica han utilitzat el model d'estenosi bilateral simètrica de les artèries caròtides (BCAS), han emprat animals joves (Lee ES et al., 2019), o bé han fet un seguiment longitudinal de curta durada (Yata K et al., 2014). En aquest estudi es van utilitzar ratolins de tres edats diferents: edat adulta, representada per ratolins de 6 mesos, edat adulta més avançada, prèvia a la vellesa, mitjançant ratolins de 12 mesos, i edat envellida, amb ratolins de 18 mesos. Tot i que els ratolins poden viure fins a més de 24 mesos, aquesta edat tan avançada els feia massa delicats, i propensos a patir altres patologies que poguessin interferir en el present estudi. A més, es va afegir un dels factors de risc més importants, l'aterosclerosi, mitjançant els ratolins ApoE^{-/-}.

Durant el segle XX es va avançar de forma notable en la comprensió de la fisiopatologia de les demències gràcies als avenços en la diagnòsi psiquiàtrica combinats amb els avenços en l'anàlisi histopatològic de teixit post-mortem. Aquests van permetre identificar fins a nivell microscòpic, les alteracions i lesions característiques dels diferents tipus de demències. Amb el desenvolupament de tècniques bioquímiques, es va poder determinar la composició bioquímica de les lesions en demència. Tot aquest coneixement ha permès entendre les bases moleculars de la demència i, consegüentment, el desenvolupament d'estratègies terapèutiques. La major part dels estudis, i per tant d'aquests avenços, s'han centrat en les proteïnopaties. També l'ús de tècniques d'imatge com la tomografia per emissió de positrons (PET) o la tomografia

computeritzada per emissió de fotó simple (SPECT) ha esdevingut una eina diagnòstica essencial en les proteïnopaties. Malauradament, en el cas de la demència vascular no es disposa de cap marcador distintiu, com podria ser el β -amiloide en el cas de la malaltia d'Alzheimer (Villemagne VL et al., 2021). La naturalesa de les alteracions vasculars associades a DV comporten alteracions funcionals heterogènies i múltiples alteracions bioquímiques. No es produeix una alteració focal del teixit cerebral sinó que cal analitzar cada regió cerebral de forma precisa per la caracterització fisiopatològica i molecular del dany vascular. L'estudi de la fisiopatologia de la demència vascular requereix una anàlisi del cervell a nivell de píxel, on tots els paràmetres d'interès s'adquireixen al mateix temps utilitzant el mateix cervell (Hossmann KA, 2006). Per aquest motiu, les eines de diagnòstic per imatge que es recomanen són CT i MRI. En la present tesi doctoral es va escollir la recerca de nous biomarcador per MRI degut a la seva capacitat multimodal.

Amb la finalitat de trobar nous biomarcadors no invasius, es van utilitzar diferents tècniques de MRI. S'han estudiat els possibles canvis en la circulació cerebral i la remodelació arterial a través d'angiografies, i els canvis en la perfusió del teixit cerebral provocats per les diferents condicions experimentals. A més, en la present tesi doctoral s'ha demostrat que biomarcadors no invasius, com l'índex Q o el DTI, podrien ser útils en la detecció de dany tissular associat a la presència d'aterosclerosi com un dels factors que podrien precipitar el desenvolupament de demència. Trets anatòmics com ara el gruix cortical, han estat descrits com a indicadors diagnòstics en la malaltia d'Alzheimer (Racine AM et al., 2018). Existeixen poques dades sobre aquest biomarcador en el cas de la DV, principalment centrats en possibles canvis del gruix de l'escorça en pacients amb lesions subcorticals (Seo SW et al., 2020). Fins on nosaltres coneixem, no existeixen estudis previs sobre de l'ús d'aquest marcador en recerca bàsica en models experimentals de DV. En el present treball s'ha validat aquesta mesura com a eina per a la detecció de les alteracions produïdes per l'envelliment i en models d'hipoperfusió crònica.

La demència és una de les principals causes de mort, de discapacitat i de pèrdua d'autonomia en les persones d'edat avançada en els països desenvolupats (Kochanek KD et al., 2016). Tot i que molts estudis han mostrat tenir un efecte protector al dany vascular en models animals, la seva translació a assaig clínic ha resultat insatisfactòria.

Els assajos clínics són costosos, requereixen temps i poden ser pesats per als pacients (seguretat, eficàcia i permanència). Per aquest motiu, cal trobar noves eines metodològiques per entendre amb major detall els mecanismes patofisiològics que condueixen al desenvolupament de la demència i, així, poder trobar tractaments efectius que facilitin la participació en aquests.

Partint de la premissa de la manca de tractament per la DV, les dificultats en el seu diagnòstic i els factors de risc importants en el seu desenvolupament la present tesi doctoral suposa un nou enfoc de l'estudi de biomarcadors no invasius per imatge de forma longitudinal, afegint els diferents factors de risc que intervenen en el desenvolupament de la patologia.

2. ENVELLIMENT I ATEROSCLEROSI

L'envelliment vascular és un procés biològic que té un paper primordial en la morbiditat i la mortalitat en persones d'edat avançada. L'envelliment de la vasculatura produeix canvis a nivell molecular i cel·lular que tenen com a conseqüència l'alteració de la paret vascular (Ungvari Z et al., 2018). Els principals mecanismes d'envelliment vascular són la disfunció endotelial, el remodelatge vascular, augment de rigidesa arterial i inflamació (Cardillo C et al., 2000; Donato AJ et al., 2009; Poggesi et al., 2016). Amb l'envelliment s'activen vies de senyalització cel·lular que porten a la desregulació de processos cel·lulars com la senescència/proliferació, l'apoptosi o l'autofàgia, conduint a la remodelació vascular (Ewald CY et al., 2015; Kang C et al., 2015; Ungvari Z et al., 2013). La remodelació vascular consisteix en el creixement i la migració de cèl·lules de la musculatura llisa a la túnica mitja, calcificació vascular i un augment del rati col·lagen/elastina per trencament de les fibres d'elastina. En conjunt, tots aquests canvis acaben resultant en una reducció del diàmetre de la llum dels vasos i un increment de la rigidesa de la paret arterial. Aquests canvis estructurals es tradueixen en canvis mecànics com l'augment de la pressió arterial o la reducció de l'intercanvi de gasos, reduint-se la biodisponibilitat d'oxigen al teixit (Csiszar A et al., 2002; Van Der Loo B et al., 2000).

L'apolipoproteïna E és una proteïna implicada, fonamentalment, en el transport i la homeòstasi del colesterol al sistema nerviós central (Mahley RW, 2016). Tot i que el cervell representa un 2% de la massa corporal, conté aproximadament un 20% del

colesterol total. D'aquest colesterol, el 70% forma les beines de mielina i el 30% restant és metabòlicament actiu i es troba a les membranes de les cèl·lules glials i les neurones, on participa en el seu remodelatge i la seva reparació. Degut a la restricció de la barrera hematoencefàlica, el colesterol es sintetitza majoritàriament al sistema nerviós per la glia, concretament en l'adult, majoritàriament és produït pels astròcits a partir de l'acetat (Vance JE i Hayashi H, 2010). Les neurones també produeixen colesterol però en menor mesura, especialment quan hi ha dany cel·lular (Xu Q et al., 2006). Tot i això, una part també arriba de la perifèria. L'apolipoproteïna A-I s'encarrega del transport de colesterol de la perifèria al cervell i ApoE de la seva distribució intracerebral i del transport del cervell cap a la seva eliminació. El dèficit d'aquesta proteïna comporta l'increment dels nivells de colesterol en sang. Quan aquesta proteïna no s'expressa no només es veuen alterades les funcions que duu a terme sinó que, a més, produeix hiperlipèmia i hipercolesterolèmia.

L'aterosclerosi és una malaltia crònica inflamatòria caracteritzada per l'acumulació de lípids en la paret arterial. Existeixen nombrosos exemples de models animals d'aterosclerosi (Emini Veseli B et al., 2017). En la present tesi doctoral es van escollir els ratolins ApoE^{-/-} perquè el colesterol en plasma incrementa amb el temps independentment del tipus de dieta que reben i desenvolupen plaques d'ateroma amb l'edat, especialment a les bifurcacions arterials.

L'excés de colesterol en sang es va acumulant a les parets dels vasos, especialment a les bifurcacions, desencadenant una resposta inflamatòria que fomenta la formació de plaques d'ateroma per la constant agressió de la paret vascular. Com a conseqüència, la paret vascular s'endureix i es fa més gruixuda de forma que produeix una reducció de la llum del vas, alterant la resposta hemodinàmica. Les plaques ateroscleròtiques poden romandre estables durant molt temps però de forma sobtada es poden trencar, produint una progressiva oclusió dels vasos i reducció del flux sanguini i un increment del risc de desenvolupar malaltia cardiovascular i cerebrovascular (Ndrepepa G et al., 2016; Ross R, 1999).

Els canvis estructurals en les principals artèries que irriguen el cervell poden induir una resposta vascular de compensació que es traduirà en canvis en la longitud i la tortuositat dels vasos (Imanishi M et al., 2014). En la present tesi doctoral es van

estudiar els canvis estructurals en les principals artèries que irriguen el cervell, que són l'artèria basilar i les artèries caròtides internes dreta i esquerra. En l'envelliment en ratolins C57Bl6 no es van detectar canvis estructurals ni en la longitud ni en la tortuositat de cap de les artèries esmentades. En canvi, l'envelliment en ratolins ApoE^{-/-} va produir un increment de la longitud de l'artèria basilar sense presentar alteracions en la tortuositat. La irrigació cerebral ve de dos grans sistemes, el sistema vertebral i el sistema carotidi. Alteracions en un d'aquests sistemes són compensades per l'altre ja que estan connectats a través del polígon de Willis. Tot i això, la longitud de l'artèria basilar en ratolins ApoE^{-/-} mai es va trobar per sobre de la del ratolins C57Bl6. De fet, aquesta era més curta en ratolins ApoE^{-/-} de 12 mesos, indicant que el possible mecanisme de compensació vascular en aquesta soca es manté per sota de la dels C57Bl6. Fins on nosaltres coneixem, aquestes alteracions no s'han detectat anteriorment en ratolins deficients per l'apolipoproteïna E. ApoE és una proteïna implicada en el transport de colesterol en sang, de forma que la seva deficiència produeix cúmuls d'aquest en sang (Brown et al., 1994). Els ratolins ApoE^{-/-} van ser descrits a l'any 1992 per dos laboratoris diferents (Zhang SH et al., 1992). Es caracteritzen per desenvolupar, de forma espontània, aterosclerosi amb l'edat (Breslow et al., 1992). Aquest fet, que els converteix en bons models animals per l'estudi de malalties neurodegeneratives (Masliah E et al., 1995), podria explicar els canvis estructurals esmentats. Les plaques d'ateroma es localitzen fonamentalment a les bifurcacions de les grans artèries de forma que podrien estar reduint el flux sanguini del sistema carotidi, explicant-se així la compensació del sistema vertebral en edat adulta avançada.

Mentre que les alteracions hemodinàmiques en ratolins ApoE^{-/-} estan amplament descrits en la bibliografia (Riedl KA et al., 2020), els canvis estructurals en les principals artèries que irriguen el cervell són contradictoris i fins on nosaltres coneixem, no s'han realitzat estudis previs on s'avalua la morfologia de les principals artèries que irriguen el cervell per angiografia TOF. En el present estudi, es va identificar un augment de la tortuositat de les artèries caròtides amb l'edat en ratolins ateroscleròtics.

Els factors de risc vascular com l'envelliment i la hipercolesterolèmia actuen sobre els diferents components de la vasculatura, especialment sobre l'endoteli, produint disfunció endotelial, que és el que es creu que acaba alterant la hemodinàmica vascular (Di Marco LY et al., 2015; Poggesi A et al., 2016 i Wardlaw JM et al., 2013). La resposta hemodinàmica vascular es va estudiar utilitzant imatges de perfusió ASL.

Les imatges de perfusió ASL tenen extraordinàries avantatges respecte altres mètodes de perfusió per MRI com ara, el seu caràcter no invasiu, ja que no requereixen d'un agent de contrast exogen. No obstant, tenen inconvenients intrínsecs i extrínsecs. El principal factor intrínsec limitant és que són imatges amb una limitada relació senyal-soroll (SNR), cosa que posa en compromís la qualitat de la imatge i, per aquesta raó, es necessiten talls de grans volums. Això implica que el temps que triga la molècula d'aigua en arribar a la posició d'adquisició de la imatge pugui produir artefactes d'intensitat. A part, la imatge de perfusió utilitzada permet detectar el flux sanguini que arriba de múltiples direccions i, com a conseqüència, es marquen protons que venen de la sang venosa. Els factors extrínsecs que més freqüentment poden produir artefactes en la imatge de perfusió ASL són la respiració, la temperatura, la freqüència cardíaca i, en el cas, de l'experimentació animal, els canvis en el control de la respiració amb l'anestèsia.

S'ha descrit que els mecanismes de regulació del flux sanguini es poden veure influenciats pels diferents factors de risc vascular, com ara l'envelliment o l'aterosclerosi. L'envelliment és el factor de risc més important no només en les malalties cardiovasculars i cerebrovasculars sinó també en el deteriorament cognitiu (Nagata K et al., 2016). L'envelliment per si sol, sense l'existència d'altres factors de risc vascular pot produir aterosclerosi, remodelatge vascular, estrès oxidatiu i canvis inflamatoris en els vasos (Nagata K et al., 2007).

Amb l'objectiu de trobar possibles canvis en la perfusió cerebral relacionats amb l'edat es va avaluar el flux sanguini cerebral per imatges de perfusió ASL. De la mateixa manera que no es van trobar canvis en l'arquitectura vascular, tampoc no es van detectar canvis en el rCBF provocats per l'envelliment en ratolins C57Bl6. Per contra, en ratolins ateroscleròtics es van detectar alteracions transitòries en el rCBF, principalment als 12 mesos d'edat, però que es veien revertides a 18 mesos. Les limitacions de la imatge ASL esmentades podrien dificultar les comparacions de rCBF entre soques i en el

temps perquè existeixen nombrosos factors externs que poden produir cert biaix sobre les quantificacions relatives. Per raons obvies, totes les adquisicions de MRI han de fer-se sota anestèsia. Això modifica la fisiologia dels ratolins, i ho fa de manera no homogènia, és a dir, cada animal reacciona de manera diferent a l'anestèsia en termes de baixada de pressió arterial, ritme cardíac, temperatura corporal, ritme respiratori, entre d'altres paràmetres fisiològics. Tot i això, aquestes variacions externes són equiparables a totes les soques, de manera que la imatge de perfusió ASL aporta informació sobre canvis de flux sanguini cerebral quan es fan estudis comparatius de diferents grups.

Estudis recents en humans mostren no només que l'envelliment "normal" produeix una reducció del flux sanguini cerebral (CBF) en estat de repòs sinó que, a més, aquesta reducció és diferents en homes que dones, sent aquestes últimes més resistents a la reducció del CBF (Tarumi T i Zhang R, 2018). En la present tesi, també es van avaluar possibles diferències en el CBF entre mascles i femelles dins del grup de ratolins ApoE^{-/-} però no es van detectar diferències significatives, probablement com a conseqüència de la reduïda mida de la mostra.

A més, l'aterosclerosi podria produir un envelliment prematur ja que en ratolins ApoE^{-/-} de 12 i de 18 mesos es va trobar una reducció del rCBF, indicant una major afectació arterial amb l'edat. Les alteracions en el metabolisme lipídic indueixen canvis mecànics i funcionals en el sistema circulatori que afecten a la perfusió cerebral en els models d'aterosclerosi (Dybas J et al., 2020). Malgrat les limitacions de les imatges ASL, no hi ha evidències prèvies de canvis en el flux sanguini cerebral amb l'envelliment en ratolins ApoE^{-/-} perquè el focus està centrat en detectar els canvis que es produeixen en els portadors de l'al·lel ε4, el major factor de risc conegut pel desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer (Lin AL et al., 2020).

L'angiogènesi és un procés cel·lular molt important en la supervivència dels tumors, la plasticitat microvascular després d'un ictus i podria ser interessant en la detecció de canvis microvasculars produïts per factors de risc vascular com, per exemple, l'envelliment o l'aterosclerosi, de forma que podrien permetre la detecció precoç de demència. S'ha descrit que amb l'edat es produeixen canvis en la homeòstasi cerebral com a conseqüència de la reducció de la densitat vascular (Schager B i Brown

CE, 2020). Partint d'aquestes premisses seria interessant trobar una manera de detectar aquests canvis microvasculars *in vivo* utilitzant eines d'imatge no invasives per aconseguir un bon biomarcador d'aquests tipus de lesions vasculars que poden derivar en demència.

L'any 1995 es va proposar una nova tècnica basada en mecanismes de contrast de susceptibilitat magnètica per la detecció de canvis hemodinàmics vasculars en un model de rata (Boxerman JL et al., 1995). Es va aplicar a l'estudi del nombre de vasos (densitat) i dels canvis de diàmetre en un model de glioma en rata (Dennie J et al., 1998). Aquests exemples posaven de manifest que la tècnica era viable però van trigar uns anys fins que es va posar a punt la tècnica actual per mesurar canvis en la densitat microvascular (EX Wu et al., 2004). Tot i així, s'han publicat relativament pocs articles relacionats, la major part d'ells focalitzats en la microvasculatura del cervell de rata. Poder utilitzar l'índex Q com a biomarcador no invasiu dels canvis en la microcirculació relacionats amb l'envelliment, l'aterosclerosi i la hipoperfusió és una de les propostes de la present tesi doctoral. Actualment hi ha evidències de que aquesta tècnica podria ser útil per detectar canvis en l'arquitectura de la microvasculatura en diferents patologies (Michel P i Chantal R, 2015) com el càncer (Kleibeuker EA et al., 2012), l'ictus (Seevinck PR et al., 2010), la malaltia d'Alzheimer (Hunter JM et al., 2012) o l'epilèpsia (Rigau V et al., 2007). Tot i el gran potencial d'aquesta tècnica, no s'ha arribat a produir el salt a la pràctica clínica. Tot això pot ser degut diversos factors, com ara la necessitat d'injectar un agent de contrast basat en nanopartícules de ferro, contraindicat en la major part de països, o a la complexitat de les bases físiques de les tècniques de MRI per la microvasculatura, la disponibilitat de les seqüències que s'han d'adquirir i de les eines de post-processament. Tot i això, tant els mètodes d'adquisició com els de processament són relativament senzills de gestionar.

Fins on nosaltres coneixem, és el primer cop que es planteja la utilització d'aquests mètodes en l'estudi de la microvasculatura en l'envelliment, l'aterosclerosi i la hipoperfusió, tots ells factors relacionats amb el desenvolupament de demència vascular. Degut a la reduïda literatura sobre l'ús de l'Índex Q, vam estimar necessari validar els resultats mitjançant la comparació amb mètodes histològics. Es van emprar

seccions procedents dels mateixos cervells, que van ser tractades per realitzar un càsting arterial i posterior clarificació del teixit per adquisició d'imatges 3D.

Es va utilitzar l'Índex Q per mesurar la densitat microvascular en ratolins C57Bl6 i es va detectar una reducció al tàlem i a l'estriat amb l'edat. Amb les mesures d'histopatologia es va detectar una reducció de la densitat microvascular en totes les regions estudiades (escorça, estriat, hipocamp i tàlem). Els resultats de l'índex Q en ratolins ApoE^{-/-} indicaven una reducció de la densitat microvascular a l'escorça, a l'estriat i a l'hipocamp, mentre que l'anàlisi histopatològic va indicar una reducció de la densitat microvascular a l'hipocamp i al tàlem. Existeixen nombroses evidències de que l'apolipoproteïna E s'associa a un desacoblament neurovascular que podria ser el mecanisme subjacent al deteriorament cognitiu (Bell R et al., 2012; Ielacqua GD et al., 2016; Koizumi K et al., 2018). Tot i que semblava que l'índex Q detectava una reducció de la densitat microvascular en més regions cerebrals en ratolins ateroscleròtics, l'anàlisi comparatiu no va mostrar diferències associades a l'aterosclerosi. En canvi, l'anàlisi histològic va mostrar una reducció de la densitat microvascular a l'escorça, al tàlem i a l'hipocamp.

Les discrepàncies entre els resultats de l'anàlisi histològic i els de l'índex Q podrien atribuir-se a diversos motius. En primer lloc, l'anàlisi histològic ens mostra la totalitat del sistema vascular a nivell microscòpic, mentre que la resolució que permet la MRI és molt més limitada. L'índex Q està optimitzat per cervell de rata i, quan s'intenta ajustar la resolució pel cervell de ratolí, la mida del vòxel ens fa augmentar el soroll, és a dir, la SNR empitjora. Aquest augment en el soroll del vòxel comporta la necessitat de filtres més restrictius en l'anàlisi, fent que els resultats puguin ser menys acurats. Tenint en compte aquestes limitacions, l'índex Q encara va ser capaç de detectar almenys part dels canvis a nivell microvascular. Un exemple d'estructura on es va detectar una menor densitat microvascular en ratolins ateroscleròtics utilitzant l'índex Q va ser l'hipocamp. L'hipocamp és una estructura cerebral implicada en la formació i la consolidació de la memòria i en processos d'atenció, molt sensible als canvis d'irrigació cerebral, que precisament es veu alterada en malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer (Zerbi V et al., 2013). Aquests resultats suggereixen que l'índex Q podria servir per detectar canvis en la densitat microvascular quan el dany és més sever com

passa amb models animals de la malaltia d'Alzheimer (Ielacqua GD et al., 2016). Tot i això, persisteix la necessitat de millorar les seqüències d'adquisició i ajustar-les a cervell de ratolí de cara a futurs estudis.

Al sistema nerviós central, la mielina és una capa multilaminar constituïda a partir de les prolongacions dels oligodendròcits. En microscòpia electrònica s'observen unes bandes fosques i unes més clares. Mentre que les bandes fosques corresponen a la superfície de les membranes citoplasmàtiques altament compactades, les més clares corresponen a la superfície de la membrana externa dels oligodendròcits. Aquesta compactació es manté gràcies a diferents proteïnes. La beina de mielina està composta per proteïnes i lípids. Entre les proteïnes que componen la mielina, destaca la proteïna bàsica de la mielina o MBP. La MBP s'encarrega de la compactació de les superfícies de dues membranes citoplasmàtiques adjacents (Redmond SA et al., 2016). La beina de mielina, a més, està composta per nivells elevats d'àcids grassos saturats de cadena llarga, glicoesfingolípid (aproximadament suposen el 20% del percentatge molar del total dels lípids) i colesterol, que representa aproximadament el 40% del percentatge molar del total dels lípids a la mielina (Schmitt S et al., 2015). Amb tècniques de MRI s'han detectat nombroses alteracions en la mielina atribuïbles a l'envelliment normal. El volum de substància blanca comença a reduir-se aproximadament als 50 anys (Sowell ER et al., 2003).

En la present tesi doctoral, es van avaluar alteracions en la mielina mitjançant imatges de DTI *in vivo* i *ex vivo*. De la mateixa manera que amb l'índex Q, es va optar per fer una validació histològica dels resultats, mitjançant immunodetecció de l'expressió de la proteïna MBP.

De manera global, els resultats dels ratolins C57Bl6 semblen indicar que l'envelliment produeix alteracions en la FA, indicant lesions en la integritat de la mielina. No obstant, no es van detectar més que subtils alteracions en la resta de components del DTI. El colesterol es sintetitza fonamentalment en els astròcits al cervell perquè la barrera hematoencefàlica impedeix el pas d'aquest al cervell (Johanson CE et al., 2011). Dins del cervell, l'apolipoproteïna E és la principal proteïna implicada en el seu transport entre cèl·lules del sistema nerviós (Gamba P et al., 2019; Posse de Chaves E i Narayanaswami V, 2008). En ratolins ApoE^{-/-}, en canvi, es van poder detectar múltiples

alteracions en tots els components del DTI. Probablement aquestes diferències es deuen a que la deficiència d'apolipoproteïna E afecta al transport de colesterol al cervell. Aquestes diferències es van confirmar amb la comparació d'aquests ratolins amb els C57Bl6 confirmant que l'aterosclerosi influeix sobre la connectivitat cerebral (Zerbi V et al., 2014).

A diferència de l'estudi per imatges de DTI, tant en ratolins C57Bl6 com en el ApoE^{-/-}, es van detectar reduccions en el marcatge per MBP en totes les regions estudiades amb l'edat. Es van poder localitzar diferències en el procés d'envelliment entre els animals deficients en ApoE^{-/-} i els animals C57Bl6. Aquestes diferències s'indiquen també amb la histologia on, ja des de les edats més joves analitzades (6 mesos), es detecten nivells inferiors d'expressió de MBP en els ratolins ApoE^{-/-}. Les alteracions en la substància blanca detectades en el present estudi estan en concordança amb estudis previs en humans on s'ha detectat una reducció de la substància blanca amb l'envelliment (Pfefferbaum A et al., 2000).

L'atrofia cerebral és una de les empremtes patològiques més comú en els diferents tipus de demència com, per exemple, la malaltia d'Alzheimer (Dickerson BC et al., 2009; Prestia A et al., 2010), la demència per cossos de Lewy (Colloby SJ et al., 2020) o associat al deteriorament cognitiu després d'un ictus (Dickie DA et al., 2020). En la pràctica clínica s'han desenvolupat eines per la mesura dels canvis de volum i gruix de l'escorça de forma automatitzada i comparable entre elles (Redolfi A et al., 2015).

Estudis per MRI mostren una reducció del gruix cortical amb l'envelliment normal, donant lloc a patrons d'atròfia específics, que persisteixen però canvien quan els pacients manifesten problemes de memòria i de fluïdesa verbal (Jones SE et al., 2019). Tot i que hi ha estudis previs sobre els gruix cortical en humans en envelliment i amb diferents patologies, fins on nosaltres coneixem no hi ha publicacions on s'hagi descrit els canvis en el gruix cortical en aquestes condicions experimentals, en aquestes edats d'estudi i sota aquests factors de risc. Per aquest motiu, es va plantejar mesurar el gruix cortical en els diferents grups experimentals de la present tesi doctoral.

Es va trobar que el gruix cortical en ratolins C57Bl6 es redueix amb l'edat, indicant que aquestes mesures poden ser bons indicadors de la predisposició a tenir atròfia cerebral.

Quan es va analitzar el gruix cortical en el grup de ratolins ApoE^{-/-} es va detectar una clara tendència a la reducció amb l'edat. No obstant, aquesta tendència no era estadísticament significativa. Quan s'afegien les femelles al grup d'animals ApoE^{-/-}, els canvis en el gruix cortical passaven a ser significatius. Aquesta diferència és deguda a que les femelles mostren un gruix cortical major a les edats més joves estudiades (6 i 12 mesos), que tendeixen a desaparèixer en edats més envellides, indicant un possible dimorfisme sexual en ratolins ApoE^{-/-}. Tot i aquestes diferències, els estudis comparatius entre els grups de mascles de les diferents edats així com entre els animals C57Bl6 i els animals ApoE^{-/-} en conjunt, no va oferir diferències significatives atribuïbles a l'aterosclerosi. Un dels problemes que ens hem trobat en aquest estudi és el nombre d'animals ApoE^{-/-} mascles disponibles en cadascuna de les edats estudiades, cosa que ens va fer incloure el grup de femelles. En el futur seria interessant i oportú continuar amb l'estudi del possible dimorfisme sexual afegint també femelles C57Bl6 de totes les edats. Hi ha evidències a la literatura sobre dimorfisme sexual en ratolins C57Bl6 de 12 setmanes que indiquen que existeixen diferències de mida de diferents estructures del cervell entre mascles i femelles. Mentre que els mascles C57Bl6 presenten un major volum en la majoria d'estructures subcorticals, les femelles mostren un major volum a l'escorça entorrinal i l'escorça prefrontal, a l'hipocamp anterior, a la fímbria i a l'hipotàlem posterior (Spring S et al., 2007). Els nivells de colesterol en sang incrementen amb l'edat i són diferents entre homes i dones (Yi S et al., 2019). A mesura que envellim, augmenten els nivells de colesterol en sang. Abans de la menopausa, les dones tenen nivells de colesterol total més baixos que els homes a la mateixa edat. Després de la menopausa, el nivells de colesterol dolent (LDL) tendeixen a incrementar en dones (Swiger et al., 2014). Hormones sexuals com la dihidroepiandrosterona (DHEA) modulen l'impacte de l'apolipoproteïna E en el metabolisme lipídic. Com a conseqüència, l'aparició d'alteracions en els lípids són més freqüents en homes que dones, que quan en presenten, sol ser en l'etapa de post-menopausa (Zofková I et al., 2002). L'edat fèrtil dels ratolins femella és fins als 13-14 mesos. Això podria explicar aquestes diferències en gruix cortical entre mascles i femelles fins als 12 mesos d'edat.

En l'actualitat, les persones que pateixen demència van al metge quan mostren algun problema cognitiu, fonamentalment relacionats amb la memòria. Les eines

diagnòstiques clíniques que s'utilitzen en aquests casos són els tests d'avaluació neuropsicològica. D'aquests tests s'obté una probabilitat de patir un determinat tipus de demència i, segons aquesta, es realitzen altres proves com el diagnòstic per imatge, per corroborar, desmentir o donar una major precisió al diagnòstic clínic. En recerca bàsica amb models animals, la forma més comú d'avaluar canvis en la conducta és mitjançant tests conductuals que pretenen reproduir de la forma més acurada possible les avaluacions clíniques. En la present tesi doctoral, es van realitzar diferents tests conductuals per avaluar canvis de caire motor, i algun de caire cognitiu com l'ansietat o la memòria de treball.

Es va avaluar l'efecte de l'envelliment en la coordinació motora en ratolins C57Bl6 i no es van detectar canvis, a diferència d'altres estudis on si les detecten (Tang et al., 2008). Es van escollir ratolins de 6 mesos per representar l'adult-jove, de 12 mesos per representar l'adult-gran i de 18 mesos per representar la vellesa. A l'article anterior, es comparen només ratolins de 2 mesos i de 18 mesos, cosa que potser permet detectar diferències més fàcilment però no representa la progressió de les alteracions que produeix l'envelliment. En canvi, en ratolins ApoE^{-/-} es va trobar una reducció de la coordinació motora amb l'edat, indicant que la deficiència de l'apolipoproteïna E pot contribuir al deteriorament de la funció motora. No obstant, la comparativa amb els C57Bl6 no va confirmar aquesta hipòtesi.

Amb l'envelliment es produeix una debilitat i fragilitat del sistema múscul-esquelètic, conseqüència de les alteracions que l'envelliment produeix sobre el mecanisme de denervació-reinnervació a la unitat motora (Hepple RT & Rice CL, 2016). En aquest cas, i d'acord amb estudis previs, es va detectar una reducció de la força muscular en totes dues soques amb l'edat i quan es comparen, indicant una alteració del sistema múscul-esquelètic amb l'envelliment (Zhu S et al., 2019) i l'aterosclerosi.

Les alteracions del sistema múscul-esquelètic amb l'envelliment (Deschenes MR et al., 2010) poden afectar a la capacitat exploratòria dels rosegadors. En la present tesi doctoral, es va trobar una reducció de la distància que recorren i de la velocitat amb la que ho fan en ratolins C57Bl6. En canvi, en ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos es va trobar una reducció de la distància recorreguda, que a més es va mantenir per sota de la dels

C57Bl6, indicant un possible envelliment prematur pel que fa a aquest paràmetre (Werner CM & Laufs U, 2018).

Existeixen nombrosos tests en rosegadors que permeten avaluar aspectes emocionals, com ara el nivell d'ansietat. Els exemples de proves conductuals per avaluar l'ansietat van des dels tests de condicionament, com la gàbia de Skinner, fins a tests més senzills com el laberint en creu. El test del camp obert tradicionalment és un test de caire motor però també s'ha utilitzat per mesurar trets d'ansietat, ja que no deixa de ser un espai tancat, sense sortida (Prut L i Belzung C, 2003). En el present estudi, tant els ratolins C57Bl6 com els ApoE^{-/-} presentaven nivells normals d'ansietat, ja que passaven més temps al voltant de les parets que a la part central de l'arena (indicador de cert nivell d'ansiolisi). Es creu que hi ha dos factors principals que influeixen en el comportament que suggereix ansietat: l'aïllament social, pel fet de treure l'animal de la seva gàbia i deixar-lo sense els seus companys de gàbia, i el canvi d'espai des de la gàbia a la arena, que acostuma a ser un espai més obert i il·luminat. Els nivells d'ansietat no van variar amb l'edat en cap de les soques. Mentre que l'envelliment no modifica els nivells d'ansietat, l'aterosclerosi en edats joves produeix un augment de l'ansietat. La deficiència en l'apolipoproteïna E, a part d'associar-se al desenvolupament d'aterosclerosi, podria produir un envelliment accelerat en ratolins ateroscleròtics previ a l'aparició de lesions vasculars associades a demència. La reducció de la distància recorreguda i del temps relatiu que passen a la regió interior de l'arena sembla indicar una menor capacitat exploratòria en ratolins de 6 mesos, que desapareix amb l'edat, cosa que podria validar la hipòtesi de que aquesta soca de ratolins podria tenir un envelliment accelerat.

3. HIPOPERFUSIÓ

Hi ha cada cop més evidències de que els factors de risc vascular contribueixen a neurodegeneració, dany cognitiu vascular i demència. Existeix una relació entre la malaltia d'Alzheimer i la demència vascular o el dany cognitiu d'origen vascular. Es creu que la hipoperfusió és el mecanisme fisiopatològic comú i subjacent a les dues patologies (Duncombe J et al., 2017; Qiu L et al., 2016; Shang J et al., 2016). A més, la hipoperfusió cerebral és el major contribuïdor al deteriorament cognitiu i a la neurodegeneració, que acaben causant demència.

Tot i que es desconeix el mecanisme patològic precís subjacent al deteriorament cognitiu vascular (VCI) i la demència vascular DV, la causa més comú és la malaltia de petit vas, que afecta a petites artèries, arterioles, vècules i capil·lars. Les lesions vasculars característiques de la VaD es podrien explicar per la hipoperfusió crònica cerebral, que constitueix, a més, a la meitat dels casos de VCI en humans (Kalaria, 2016). La reducció de la perfusió cerebral es correlaciona amb la severitat de la demència i prediu quins individus amb deteriorament cognitiu lleu acabaran desenvolupant demència.

Per totes aquestes raons, la recerca bàsica d'aquesta malaltia s'ha centrat en desenvolupar models d'hipoperfusió crònica en rates, ratolins i primats (Washida K et al., 2019). Existeixen nombrosos models animals d'hipoperfusió crònica però cap reproduceix amb exactitud totes i cadascuna de les lesions característiques ni del VCI ni de la VaD. En la present tesi doctoral, es proposa un nou enfoc en l'estudi de la VaD que combina diferents factors de risc amb l'objectiu de trobar biomarcadors per imatge fiables que permetin comprendre millor la patologia i detectar-la abans de que aparegui la simptomatologia, per tal de poder trobar nous fàrmacs.

La hipoperfusió cerebral crònica es pot generar per diferents mecanismes. En rata, es pot generar per oclusió bilateral de les artèries caròtides comunes (BCAO). En ratolins, per estenosi bilateral de les artèries caròtides comunes (BCAS) o estenosi asimètrica de les artèries caròtides comunes (ACAS). En canvi, en primats no humans es necessita la oclusió de tres vasos (3VO), que consisteix en una oclusió bilateral de les artèries caròtides internes i la oclusió de l'artèria vertebral esquerra, per a induir hipoperfusió.

El model d'hipoperfusió més emprat en recerca és el BCAS degut a la seva reproductibilitat i a la possibilitat d'aplicar-ho en models transgènics (Bannai T et al., 2019; Bink DI et al., 2013; Hattori Y et al., 2014). No obstant, el model BCAS té com a limitació principal una reducció sobtada del rCBF, que no replica el patró comú del deteriorament cognitiu vascular (VCI) en humans (Washida K et al., 2019). BCAS presenta alteracions cognitives sense alterar-se la funció motora abans dels 3 mesos després de la cirurgia (Hainsworth AH i Markus HS, 2008) i rarefacció de la substància (blanca? grisa?) sense manifestar infarts (Nishio K et al., 2010). Aquestes alteracions no

refleixen exactament les lesions característiques de la demència vascular. Per aquest motiu, es va desenvolupar el model ACAS que, a diferència de l'anterior, presenta una reducció progressiva del rCBF i amb certa capacitat de recuperació amb el temps, i també presenta dany a la substància blanca relacionada amb el desenvolupament d'infarts (Washida K et al., 2019).

En la present tesi doctoral es van avaluar canvis en els diferents paràmetres de MRI, conducta i histopatologia per detectar les alteracions que produeix la hipoperfusió per estenosi asimètrica de les de les artèries caròtides comunes. Tal i com s'ha explicat a l'apartat metodològic, el model ACAS es caracteritza per la implantació asimètrica de dos aparells diferents en cada artèria caròtida comuna. A l'artèria caròtida comuna dreta (CCD) s'implanta un anell ameroïde de caseïna, que redueix el flux sanguini progressivament a mida que s'hidrata, fins que es tanca totalment, oclouent el vas. A l'artèria caròtida comuna esquerra (CCE) s'implanta un microespiral que redueix el flux sanguini fins a un 30% de forma sobtada i permanent. El model experimental es va aplicar en les dues soques de ratolins i a les mateixes edats anteriorment esmentades.

Es van estudiar els canvis en la longitud i la tortuositat dels principals vasos que irriguen el cervell, l'artèria basilar (AB) i les artèries caròtides internes dreta (ACId) i esquerra (ACIe), mitjançant imatges d'angiografia TOF. La principal conseqüència de la inducció d'hipoperfusió mitjançant ACAS és la progressiva reducció del senyal de l'ACId a partir dels 7 dies de la seva implantació, produint alteracions asimètriques entre l'hemisferi dret i l'esquerre (Washida K et al., 2019). En cap cas es van detectar alteracions en l'artèria basilar, com a mecanisme de compensació vascular per part de la irrigació procedent del sistema vertebral a diferència d'estudis fets en rata amb el model BCAA, probablement perquè és molt més agressiu que el que s'ha utilitzat en aquest estudi (Soria G et al., 2013). En aquest cas hi ha part d'irrigació de l'arteria esquerra, indicant que hi hagut prou temps per intentar compensar. Per aquesta raó, potser els canvis anatòmics necessaris per aquesta compensació no són tan evidents com en el cas de la BCAS, probablement perquè és molt més agressiu que el que s'ha utilitzat en aquest estudi (Soria G et al., 2013). En la present tesi doctoral es va trobar una reducció de la longitud de l'ACId dos mesos després de la cirurgia en ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos, indicant aquests ratolins tenen una resposta vascular menys resistent que els C57Bl6 en

edats joves. En les edats més avançades (12 i 18 mesos) la longitud de les artèries caròtides internes tendia a ser menor en els animals ApoE^{-/-}, arribant a ser una diferència significativa en alguns dels temps posteriors a la hipoperfusió. D'altra banda, la ACId sempre va mostrar unes diferències més marcades entre les dues soques. Diversos mecanismes poden estar jugant un paper en la producció d'aquestes diferències. Per una banda, el fet que la ACId queda tancada totalment al cap d'un temps després de l'operació fa deixi de rebre la pressió sanguínia directa del cor, cosa que pot afectar l'endoteli i l'elasticitat de l'artèria. Per altra banda, s'ha descrit que els ratolins ateroscleròtics perden capacitat de vasodilatació a partir de certes edats, quan es comença a manifestar l'aterosclerosi (Yang R et al., 1999). A més, en els ratolins ApoE^{-/-} la resposta a estrès vascular no és igual en vasos petits que en les grans artèries. Amb l'edat hi ha una pèrdua de la capacitat de remodelació de de l'artèria caròtida, possiblement deguda a una acumulació excessiva de lípids al llarg de la làmina elàstica interna i dins de la làmina mitja, provocant la mort cel·lular i pèrdua de la capacitat normal de remodelació (Seo HS et al., 1997). Aquestes diferències vasculars no es donen només en la irrigació cerebral. En ratolins joves ApoE^{-/-}/LDR^{-/-} s'han detectat rarefaccions a nivell capil·lar i una reducció de la seva densitat als testicles (Steinfeld K et al., 2018). A més, s'associa als ratolins ApoE^{-/-} a una pèrdua de la capacitat de reparar i remodelar l'endoteli olfatori (Nathan BP et al., 2010). En els ratolins més vells, les diferències es veuen reduïdes, indicant un efecte de l'edat també en els ratolins C57Bl6.

L'anàlisi de la perfusió cerebral va mostrar un comportament molt heterogeni en estat basal a totes les edats. Posteriorment a l'operació, sembla haver una major reducció de flux sanguini en els animals ApoE^{-/-}, tot i que, com ja s'ha explicat, el difícil control dels paràmetres fisiològics durant el període d'adquisició, en què els ratolins estan sota anestèsia, fa que la variabilitat sigui molt elevada, fent difícil obtenir resultats sòlids. En altres treballs (Hattori Y et al. 2014) s'ha descrit una disminució gradual del CBF amb aquest mateix model experimental.

El fet de ser un model asimètric podia generar diferències en el flux sanguini entre hemisferis. Es van comparar els valors de rCBF dos mesos després de la hipoperfusió crònica, distingint entre hemisferis. En totes les edats, els ratolins ApoE^{-/-} presentaven menor perfusió en tots dos hemisferis, sense que les diferències arribessin

a ser significatives, tret dels animals de 12 mesos. Amb aquestes dades no podem concloure si aquestes diferències es deuen a un efecte transitori, que es veu igualat en la vellesa, o bé és un efecte de la mostra i la seva variabilitat. Són necessaris més experiments per aclarir aquesta qüestió. Altres autors (Hattori Y et al. 2015) han descrit diferències entre hemisferis en la perfusió, que varien al llarg del temps i també en funció de l'estructura cerebral. Analitzant el rCBF per regions d'interès, es va detectar una reducció del flux en totes les soques i en tots els temps estudiats. També va haver diferències entre soques a nivell de l'estriat, on ja hi havia un nivell basal menor en animals ApoE^{-/-} de 12 i 18 mesos. És possible que l'estriat compensi pitjor les alteracions produïdes per l'aterosclerosi amb l'edat, ja que no compta amb tanta irrigació colateral com en el cas de l'escorça.

Els canvis a nivell de la microvasculatura produïts per l'envelliment, o com a conseqüència de l'aterosclerosi, podrien afectar a la biodisponibilitat d'oxigen en el teixit cerebral, contribuint a la mort cel·lular que produeix el deteriorament cognitiu d'origen vascular. La hipoperfusió en el cervell envellit estimula la producció de HIF1 α i VEGF, induint la formació de nous vasos de forma patològica (Vagnucci AH i Li WW, 2003). És esperable que aquesta situació es vegi potenciada amb la inducció d'hipoperfusió, ja que en humans el VCI es conseqüència de la patologia microvascular produïda per la hipertensió, la diabetis i factors genètics com l'arteriopatia cerebral, amb infarts subcorticals i leucoencefalopatia. En la descripció original del model experimental, Hattori i col·laboradors indicaven que el model no va mostrar signes de desenvolupament de patologia microvascular (Hattori Y et al., 2015). Tot i així, també aclarien que el model havia estat descrit en animals joves i sense cap comorbiditat, i que no era descartable trobar aquest tipus d'afectació en animals afectats d'algun factor de risc com hipertensió, obesitat, diabetis o dislipèmia, entre d'altres.

En el present treball s'ha avaluat els possibles canvis en la densitat microvascular mitjançant l'índex Q (EX Wu et al., 2004) *in vivo*, i per imatges de microscòpia d'alta resolució *ex vivo*. El resultat de l'estudi *in vivo* no van permetre trobar diferències atribuïbles a la hipoperfusió en cap de les soques. En primer lloc, no es van poder localitzar diferències entre els hemisferis a cap de les edats. Tan sols l'anàlisi per regions d'interès va mostrar alguna diferència entre les dades inicials i finals, concretament a

nivell de l'hipocamp dels animals ApoE^{-/-} de 6 mesos d'edat. La dificultat per trobar diferències a nivell microvascular *in vivo* podria deure's a que el rosegadors són més resistents a la hipoperfusió que els humans dificultant la detecció d'alteracions de l'índex Q i, més concretament el model asimètric d'hipoperfusió, que és menys agressiu que altres com el BCAS o el BCAO. Una altra possibilitat és que les diferències siguin petites i aquesta tècnica no sigui prou sensible per detectar *in vivo* els possibles canvis subtils en la microcirculació. Com ja s'ha discutit anteriorment, l'Índex Q presenta encara una sèrie de problemes tècnics a millorar, optimitzant les adquisicions per cervell de ratolí, o bé la necessitat d'una major intensitat de camp magnètic per tal d'obtenir millors dades de MRI, com en el cas d'altres treballs on s'han emprat escàners de 9,4T (Ielacqua GD et al., 2016).

A trets generals, l'estudi *ex vivo* sí va mostrar una reducció de la densitat microvascular, sent lleugerament més baixa en totes les estructures a 6 i 12 mesos en ratolins C57Bl6, però sense canvis en els animals de 18 mesos. En els ratolins ApoE^{-/-} es va mantenir la mateixa tendència a la reducció de la densitat microvascular a totes les edats i a totes les estructures analitzades. També s'ha de tenir present que els valors inicials en els ratolins ApoE^{-/-} eren lleugerament inferiors que en els cas del C57Bl6. Comparant la densitat microvascular a temps final, dos mesos després d'hipoperfusió crònica, es va veure clarament que els ratolins ApoE^{-/-} tenien una densitat microvascular menor en estructures com el tàlem i l'hipocamp. Tal i com ja s'ha esmentat, d'entre totes les estructures cerebrals, la més sensible a la hipoperfusió és l'hipocamp (Somredngan S i Thong-asa W 2017). Estudis previs en models animals de la malaltia d'Alzheimer mostren patrons de vulnerabilitat a la hipoperfusió diferencial entre l'escorça i el tàlem (Dickie et al., 2020), que no s'han trobat en aquest estudi. L'hipocamp que és, per moltes raons, l'estructura més utilitzada per l'estudi de la neurodegeneració induïda per la hipoperfusió cerebral, està altament involucrada en l'aprenentatge espacial i la memòria. La hipoperfusió cerebral induïda per ACAS afecta de forma asimètrica les neurones de la capa CA1 de l'hipocamp (Hattori Y et al. 2015), tot i que l'atrofia hipocampal és més acusada en el model BCAS (Nishio K et al., 2010).

Analitzant tots els resultats en conjunt, podem dir que la FA disminueix com a conseqüència de la hipoperfusió crònica en totes dues soques, d'una manera més

marcada en les adquisicions *in vivo*, i aquestes diferències es veuen reduïdes en les mostres *ex vivo*, tot i que es manté la tendència, o fins i tot la diferència estadísticament significativa en algunes de les estructures analitzades, principalment aquelles riques en contingut de mielina. D'altra banda, contràriament al que era d'esperar, la MD va mostrar una caiguda significativa en les adquisicions *in vivo*. Aquesta caiguda deixava de ser significativa en les mostres *ex vivo* dels ratolins C57Bl6 i es revertia totalment en els ratolins ApoE^{-/-}. La caiguda de MD en les mostres *in vivo* podria estar influenciada per canvis en la compartimentalització de l'aigua en els cervells dels ratolins operats, o a canvis en la densitat cel·lular deguts a un increment en la reactivitat glial post-cirurgia.

El contingut cel·lular de la substància blanca és menor al de la substància grisa, de manera que només se li dedica 1/3 de la irrigació cerebral (Iadecola, 2013), fet que la fa més susceptible a la hipoperfusió amb l'envelliment (Love S i Miners JS, 2016; Nasraby SE, Rizvi et al., 2018). Hi ha un ventall molt heterogeni de resultats a la literatura sobre els canvis en la substància blanca en models d'hipoperfusió. Amb la voluntat de donar més potència als experiments actuals, es va optar per una doble adquisició i anàlisi, de manera longitudinal a diferents temps després de l'operació (*in vivo*) però també a més alta resolució a temps inicial i final (*ex vivo*). A trets generals, en el model experimental d'aquest estudi es va trobar una reducció de FA amb la hipoperfusió, i aquesta reducció era independent de l'hemisferi analitzat, de l'edat dels ratolins, o de la soca. Quan es van analitzar les mostres *ex vivo*, aquesta reducció de FA es va veure reduïda, de manera que només algunes estructures riques en substància blanca mostraven una tendència a la reducció dos mesos després d'hipoperfusió en animals ApoE^{-/-}. D'altra banda, la difusivitat mitja disminuïa en tots els animals C57Bl6 després de l'operació, i també en els ApoE^{-/-}, tret dels d'edats més avançades, on els nivells eren baixos des del temps basal, i no mostraven canvis després de la hipoperfusió. En l'anàlisi de les mostres *ex vivo*, els resultats van ser molt variables. Mentre que en animals C57Bl6 hi havia una tendència a la disminució, en els ratolins ApoE^{-/-} hi havia alguna pujada significativa en alguna estructura específica, com ara la comissura anterior o l'hipocamp.

La interpretació de resultats pot resultar complexa. L'ús dels components del DTI com a eina diagnòstica ha estat descrita en diverses patologies, on s'ha utilitzat per

detectar canvis en la integritat de les fibres en substància blanca i en substància grisa que correlacionen amb les funcions cognitives (Kazumata K et al., 2020). Però l'adquisició i anàlisi de seqüències de DTI en models experimentals de patologies cerebrals és més complexe i mostra molta variabilitat. Concretament, en models d'hipoperfusió en ratolins s'ha descrit que el DTI es un marcador prou sensible per detectar canvis subtils en la patologia que afecta la substància blanca (Holland PR et al., 2011). Tot i així, quan s'analitzen els resultats d'aquest treball, pràcticament no hi ha diferències en MRI, mentre que sí en l'anàlisi histopatològic. Altres autors, fent servir un model d'estenosi bilateral en ratolins envellits, han descrit les dificultats per trobar diferències en l'anàlisi dels components del DTI, necessitant una anàlisi matemàtica complexa per aconseguir detectar diferències subtils en algunes estructures de la substància blanca (Boehm-Sturm P et al., 2017). La heterogeneïtat reportada per altres grups va des de la descripció de canvis en les difusivitats però no en l'anisotropia fraccional (Füchtemeier M et al., 2015), a canvis en la FA però no en la MD (Holland PR et al., 2011, 2015). Les discrepàncies entre els resultats exposats en estudi els de la literatura poden tenir diversos orígens. Per una banda, el model animal escollit, que difereix en l'asimetria. Com ja s'ha comentat al llarg d'aquesta tesi, la majoria de models animals són simètrics i d'aparició aguda de la patologia. En aquest cas, els esdeveniments patològics poden haver-se donat de manera més gradual, i tenir conseqüències en quant als resultats en la substància blanca a llarg termini. D'altra banda, les comorbiditats afegides a l'estudi. Les diferents edats estudiades, així com el model d'aterosclerosi, poden afegir més fonts de variabilitat. Un punt important a tenir en compte és la correlació entre les variacions de CBF i les alteracions en la substància blanca. Diversos autors apunten a la necessitat de corregir l'anàlisi de DTI en funció dels canvis en flux sanguini, ja que aquests poden alterar els valors de MD i FA (Urushihata T et al., 2018). En el nostre cas, la variabilitat en les adquisicions de CBF faria difícil aquest tipus de correlació. Com ja s'ha comentat, els valors de CBF en animal anestesiats són molt difícils de valorar, ja que les condicions poden variar molt entre cada ratolí i, fins i tot, en el mateix ratolí en diferents sessions de MRI.

En el que coincideix la majoria d'autors és en el fet que las alteracions de tipus hipòxic en la mielina es presenten com a canvis molt subtils en la substància blanca. Per això, la majoria coincideixen en la necessitat de comparar els resultats amb l'anàlisi

histopatològic del teixit. En el present estudi es va trobar un lleuger augment de la gliosi després de dos mesos d'hipoperfusió crònica, sobre tot en els animals de més edat, i principalment en els ApoE^{-/-}. Aquesta reactivitat glial després d'hipoperfusió també ha estat descrita en altres models d'hipoperfusió (Holland PR et al., 2011; Soria G et al., 2013), tot i que d'altres han reportat que no hi ha canvis destacables en la reactivitat glial (Boehm-Sturm P et al., 2017). A més, l'anàlisi de l'expressió de MBP mostrava uns nivells menors després de dos mesos d'hipoperfusió, i que aquests nivells eren menors en els animals ApoE^{-/-} i en els C57Bl6 a les edats més joves, tot i que aquestes diferències desapareixien en els animals més envellits. Altres autors han descrit canvis histològics a nivell de la mielina (Holland PR et al., 2011), però també l'absència d'aquest canvis (Boehm-Sturm P et al., 2017). Un cop més, es fa difícil la comparativa, donat que els models animals difereixen en quan al tipus de model experimental i a les edats dels animals.

De la mateixa manera que en altres tipus de demències, els pacients amb demència vascular presenten atrofia cortical deguda a l'efecte de la hipoperfusió sobre la mort neuronal (Iadecola, 2013). En els nostres animals, el gruix cortical associat a la hipoperfusió en ratolins C57Bl6 no es va reduir en ratolins joves, mentre que sí hi havia reducció gradual en els ratolins d'edat més avançada, essent una reducció asimètrica en el cas dels ratolins més vells. En els ratolins deficientes en ApoE el comportament és similar, tot i que les diferències entre hemisferis en els ratolins de 18 mesos eren més marcades. Tot i que d'altres models d'hipoperfusió no han trobat canvis en el gruix de cap estructura cerebral analitzada, incloent-hi l'escorça (Nishino A et al., 2016), també és cert que aquest cas s'ha afegit el factor edat, que com ja s'ha comentat, pot influir en aquest paràmetre. Estudis amb animals transgènics com a model de la malaltia d'Alzheimer han mostrat un comportament semblant, indicant que l'edat és un factor important en els canvis de gruix de l'escorça (Hébert F et al., 2013).

Pel que fa a les diferències entre soques, podria ser deguda, almenys en part, a la presència de femelles, com ja s'ha comentat anteriorment. Les femelles no només partien d'un gruix cortical superior als mascles en estat basal, sinó que podrien presentar major resistència a la hipoperfusió induïda per ACAS. Són necessaris més

estudis que es centrin en les diferències entre gèneres en resposta a hipoperfusió crònica.

Els models animals d'hipoperfusió s'utilitzen per comprendre els mecanismes patològics subjacents a la demència vascular perquè les alteracions vasculares que es produeixen s'associen a alteracions de memòria i alteracions motores i sensibles (Washida K et al., 2019). A part de totes les alteracions vasculares que s'han descrit del model d'hipoperfusió ACAS, també s'han descrit alteracions motores típiques de les condicions patològiques que produeixen hipoperfusió en humans, com ara alteracions en la marxa i debilitat muscular (Adelborg K et al., 2017; Chopard R et al., 2018; De Bruijn RF et al., 2015; Demarin V et al., 2012; Gray VL et al., 2020; Wolters FJ et al., 2017).

Com ja es va mostrar en l'estudi comparatiu entre soques, sense hipoperfusió, el temps de latència disminueix amb l'edat, i de manera més marcada en els ApoE^{-/-}, però no es va trobar cap diferència deguda a hipoperfusió. Altres autors han descrit que no han trobat canvis en coordinació motora mitjançant el test de rotarod, emprant el model BCAS i en animals joves (Shibata M et al., 2007). En canvi, els autors que van descriure el model animal emprat en aquest estudi sí van trobar alteracions en la marxa (Hattori Y et al., 2015). No podem descartar que els possibles efectes de la hipoperfusió hagin quedat emmascarats per l'efecte del factor edat. Per altra banda, la força muscular es veia afectada amb la hipoperfusió en totes dues soques, sense manifestar-se diferències entre ratolins C57Bl6 i ratolins ApoE^{-/-} en cap de les edats d'estudi. Aquests resultats semblen indicar que la força muscular és un millor indicador de possibles efectes de la hipoperfusió que no pas la coordinació motora.

També s'ha descrit que el model d'hipoperfusió ACAS altera les funcions executives de forma dependent d'hipocamp, és a dir, alterant-se l'aprenentatge i la memòria (Lee ES et al., 2019). Aquestes alteracions conductuals s'han descrit a partir de la utilització de proves de conducta com el laberint en forma de Y o el test de Morris. Per manca de l'espai per realitzar aquestes proves, en aquest estudi s'han avaluat altres paràmetres com la capacitat exploratòria o la memòria de treball, mitjançant el test del camp obert o el de reconeixement de nous objectes, respectivament. En el primer cas, tot i no detectar-se alteracions en la distància recorreguda degudes a la hipoperfusió, es veu una diferència entre animals C57Bl6 i ApoE^{-/-}. Mentre que els

primers es mouen més distància a edats joves i disminueixen aquesta distància amb l'edat, els segons tendeixen a moure's molt menys, ja des dels 6 mesos. Es va trobar també una reducció de la velocitat amb la hipoperfusió en ratolins ApoE^{-/-}, indicant que aquests tenen tendència a moure's menys després de hipoperfusió crònica.

Pel que fa a l'ansietat, els animal ApoE^{-/-} es mantenen la major part del temps a la perifèria del camp obert, especialment en edats joves. Un punt important a tenir en compte és el fet que, com ja s'ha indicat, els ratolins ateroscleròtiques es movien menys i a menys velocitat que els C57Bl6. Això per sí sol, podria explicar aquest comportament entre soques pel que fa al temps que passaven a prop de la paret del camp obert.

S'han descrit alteracions en la memòria a curt termini en els models animals que mimetitzen la hipoperfusió en humans (Washida K et al., 2019). En el present estudi, no es va trobar cap tendència ni cap diferència clara entre soques en cap punt temporal. Les instal·lacions on s'havien de fer les proves de comportament no disposaven dels tests més adequats per les proves de memòria més adequades per aquest tipus d'estudi, com serien el laberint aquàtic de Morris i els laberints en forma de Y i en forma de T.

La majoria de les petites diferències trobades en els diferents paràmetres comportamentals entre les dues soques s'equiparen en ratolins de 18, validant la hipòtesi de que amb l'envelliment tendeixen a desaparèixer les diferències atribuïbles a l'aterosclerosi, que produiria un envelliment prematur. Les alteracions conductuals en ratolins ApoE^{-/-} de 6 mesos no només confirmen un envelliment accelerat en ratolins ApoE^{-/-}, sinó posen de manifest la necessitat de combinar factors de risc de demència vascular per tal de comprendre amb major precisió la seva fisiopatologia.

Tots aquests resultats s'han extret del grup complet d'ApoE^{-/-}, que inclou mascles i femelles i podria ser que els resultats no acabessin d'encaixar amb el que es coneix fins a les hores perquè la deficiència d'apolipoproteïna E és generalitzada i no és d'una isoforma en concret (Raber J et al., 2002). A part en aquest mateix estudi es van trobar diferències entre mascles i femelles atribuïbles a un efecte protector dels andrògens en femelles que no s'ha trobat en l'estudi de la present tesi doctoral degut al petit tamany de la mostra.

4. FUTURES DIRECCIONS

En el present treball de tesi doctoral s'han detectat una sèrie de problemes i limitacions que cal resoldre o millorar de cara a futurs estudis. Entre ells, les limitacions d'espais, de nombre d'animals disponibles, l'elevat cost econòmic del manteniment de colònies d'animals envellits i de l'ús dels equips de MRI, entre d'altres. Alguns d'aquests problemes s'han intentat resoldre a mida que sorgien, com ara el nombre d'animals, que va fer que s'inclouessin femelles en els animals amb deficiència en l'apolipoproteïna E. Seria interessant poder acabar l'anàlisi comparatiu dels possibles dimorfismes sexuals amb un grup major de femelles, així com femelles en el grup de ratolins C57Bl6.

Inicialment, l'estudi es va plantejar com la combinació de factors de risc no modificables com l'envelliment i els factors de risc vascular modificables més rellevants com ara, la hipertensió i l'aterosclerosi. Es van col·locar bombes d'infusió d'angiotensina II en un grup de ratolins ApoE^{-/-} de 6 i 12 mesos i es van estudiar abans de la cirurgia i a 21 dies de l'inici de la infusió amb l'objectiu de determinar l'efecte de la hipertensió i l'envelliment en la formació d'hemorràgies, tal com s'ha descrit en la literatura (Alharbi et al., 2016). En un grup pilot no es va localitzar cap signe de transformació hemorràgica induïda per angiotensina II. Es va decidir centrar els nostres esforços en les altres branques de l'estudi. Resta pendent una millora en la metodologia per induir hipertensió per tal de poder realitzar futurs estudis en models d'hipoperfusió en animals hipertensos.

Per comprendre millor les alteracions en el flux sanguini cerebral sense artefactes deguts als factors extrínsecs esmentats al llarg de la discussió, caldria trobar eines de validació, com podria ser l'anàlisi de la perfusió per tècniques òptica difusa, com ara el làser Speckle. També cal optimitzar les seqüències d'adquisició de MRI per tal de reduir el soroll de fons del senyal de la imatge de perfusió ASL.

Amb la finalitat de confirmar o desmentir la utilitat de l'índex Q en la mesura *in vivo* de la densitat microvascular, caldria optimitzar els paràmetres com en altres estudis previs (Bosomtvi, A et al., 2011) amb una resolució menor i, per tant, millor relació senyal/soroll, així com millorar la monitorització dels diferents paràmetres fisiològics per intentar fer una normalització de resultats en funció d'aquests valors variables. En

relació a la hipoperfusió, inclús caldria comparar els resultats amb un model animal més agressiu que desenvolupi patologia microvascular, com és el model BCAS.

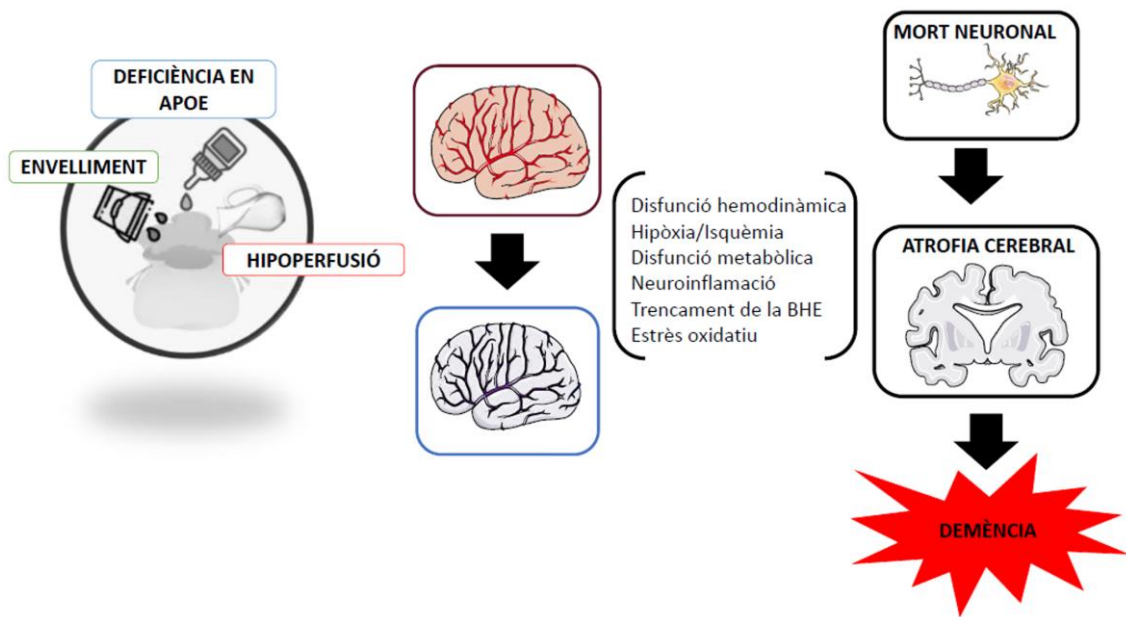
L'estudi exhaustiu mitjançant MRI de les alteracions vasculars en l'envelliment, l'aterosclerosi, la hipertensió i la hipoperfusió, validat mitjançant l'estudi histopatològic del teixit *ex vivo*, s'hauria de validar amb proves conductuals de caire cognitiu amplament utilitzades en altres estudis, com el laberint en forma de Y o el test Morris. La logística d'establiment i sessions de MRI ha fet impossible realitzar aquest tipus de proves conductuals complexes.

Els resultats de la present tesi doctoral han mostrat que la capacitat multimodal de la MRI és una eina excel·lent per ser aplicada a l'estudi de la neuropatologia de l'envelliment, l'aterosclerosi i la demència vascular per hipoperfusió en recerca traslacional. La hipòtesi d'aquest treball era proposar un nou enfoc dels estudis de la fisiopatologia de la demència vascular de manera longitudinal mitjançant tècniques de MRI que permeten combinar els diferents factors de risc de la demència: envelliment, deficiència de l'apolipoproteïna E i la hipoperfusió. Tots aquests factors produeixen alteracions vasculars que amb el temps acaben produint alteracions en el flux sanguini. Les alteracions del flux sanguini cerebral provoquen una disfunció de la resposta hemodinàmica produint hipòxia, disfunció metabòlica, neuroinflamació, trencament de la barrera hematoencefàlica i estrès oxidatiu. Per tant, l'estudi longitudinal per MRI de la contribució de tots els factors esmentats permetrà esbrinar el mecanisme fisiopatològic subjacent a les alteracions vasculars que condueixen a mort neuronal i l'atrofia cerebral, subjacents a la demència.

Aquest estudi no és més que la punta de l'iceberg en l'estudi de la demència vascular però és de rellevant importància ja que és el primer que es realitza combinant l'envelliment, la deficiència d'apolipoproteïna E en el model asimètric de demència vascular per hipoperfusió crònica.

El principal missatge d'aquest treball és que amb les diferents tècniques de MRI s'han pogut detectar alteracions vasculars associades a factors de risc vascular en edats joves que podrien permetre iniciar cribatges en poblacions de risc a desenvolupar demència vascular per tal de poder trobar un biomarcador no invasiu que ajudi a

detectar les alteracions prèvies al desenvolupament de demència. per exemple, escollir una població constituïda per persones d'edat avançada amb tendència a l'aterosclerosi i, per tant, amb risc de desenvolupar hipoperfusió cerebral. La hipoperfusió cerebral desencadena tot un conjunt d'alteracions cel·lulars i moleculars a nivell vascular, que explicarien la mort neuronal i l'atrofia cerebral que caracteritzen la demència. tenint en compte aquesta explicació, s'obriria un important camp de recerca en trobar noves teràpies pal·liatives.



CONCLUSIONS

1. La MRI multimodal és una eina excel·lent per avaluar la neuropatologia vascular associada a l'envelliment, l'aterosclerosi i la demència vascular per hipoperfusió en recerca traslacional.
2. Les imatges d'angiografia son útils en la detecció d'alteracions vasculars relacionades amb l'aterosclerosi i l'envelliment, així com els canvis anatòmics associats al model d'hipoperfusió asimètrica.
3. La perfusió per ASL permet detectar alteracions en el flux sanguini cerebral associades a aterosclerosi i hipoperfusió. La variabilitat procedent dels diferents factors fisiològics fa necessària una millora i refinament del mètode d'adquisició en el futur.
4. L'Índex Q suposa una eina prometedora en l'estudi dels canvis patològics de la microcirculació. Tot i detectar canvis en la microcirculació atribuïbles a l'envelliment, aquest mètode no és, ara per ara, prou sensible per fer-ho en el model ateroscleròtic o el d'hipoperfusió, que sí són detectables per mitjans histològics.
5. L'anàlisi dels components de les imatges de DTI són suficients per detectar alteracions en la substància blanca degudes a l'envelliment, l'aterosclerosi i la hipoperfusió crònica. Tot i així, és menys sensible que els mètodes tradicionals histològics, que detecten aquestes alteracions a nivell microscòpic.
6. Els canvis en el gruix cortical poden ser útils en la detecció de les conseqüències de les alteracions vasculars produïdes per l'envelliment, l'aterosclerosi i la hipoperfusió.
7. El model animal d'hipoperfusió crònica asimètrica (ACAS) és apropiat per l'estudi d'alteracions vasculars associades a DV, en representar millor els processos patològics que tenen lloc en humans, i conferint major poder traslacional als resultats.
8. El model animal emprat en l'estudi d'hipoperfusió ACAS combinat amb factors de risc de DV com l'envelliment i l'aterosclerosi representen millor la patologia que es dona en humans i, per tant, aquest estudi té un elevat poder traslacional.
9. Els principals canvis detectats associats a l'envelliment són alteracions microvasculars que produeixen alteracions en el flux sanguini cerebral i en la morfologia arterial exacerbades en ratolins ApoE^{-/-}, alteracions en la FA i la MD,

i menor expressió de MBP, agreujades en ratolins ateroscleròtics, atrofia cortical i alteracions motores, com la debilitat muscular i alteracions en la marxa en totes dues soques, manifestant-se en edats més joves en ratolins ApoE^{-/-}, indicant un possible envelliment prematur.

10. Les principals alteracions causades per la hipoperfusió i detectables per MRI van ser: major vulnerabilitat de l'artèria caròtida interna dreta en ratolins ateroscleròtics ja des d'edats joves, diferències de perfusió entre hemisferis en els animals ateroscleròtics més envellits, atrofia cortical associada a la hipoperfusió, que fins i tot va mostrar diferències entre hemisferis en les dues soques i de gènere en el grup de ratolins ApoE^{-/-}, dany a la substància blanca detectat mitjançant alteracions en la FA i la MD, i disminució de la força muscular i alteracions en la marxa.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Abbott, NJ et al (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
 - Abdelkarim, D et al (2019). A neural-vascular complex of age-related changes in the human brain: Anatomy, physiology, and implications for neurocognitive aging. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 107(August), 927–944. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.09.005>
 - Adelborg, K et al (2017). Heart failure and risk of dementia: a Danish nationwide population-based cohort study. *European Journal of Heart Failure*, 19(2), 253–260. <https://doi.org/10.1002/ejhf.631>
 - Alharbi, BM et al (2016). Animal models of spontaneous intracerebral hemorrhage. *Neurological Research*, 38(5), 448–455. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1144671>
 - Allan, LM et al (2011). Long term incidence of dementia, predictors of mortality and pathological diagnosis in older stroke survivors. *Brain: A Journal of Neurology*, 134(Pt 12), 3716–3727. <https://doi.org/10.1093/brain/awr273>
 - Arnaoutoglou, NA et al (2019). Dementia with Lewy bodies — from scientific knowledge to clinical insights. *Nature Reviews Neurology*, 15(2), 103–112. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0107-7>
 - Assal, F. (2019). History of Dementia. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, 44, 118–126. <https://doi.org/10.1159/000494959>
 - Aung, WY et al (2013). Diffusion tensor MRI as a biomarker in axonal and myelin damage. *Imaging in Medicine*, 5(5), 427–440. <https://doi.org/10.2217/iim.13.49>
 - Auriel, E et al (2014). Microinfarct disruption of white matter structure: a longitudinal diffusion tensor analysis. *Neurology*, 83(2), 182–188. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000579>
 - Avants, BB et al (2008). Symmetric diffeomorphic image registration with cross-correlation: evaluating automated labeling of elderly and neurodegenerative brain. *Medical Image Analysis*, 12(1), 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.media.2007.06.004>
 - Bagher, P i Segal, SS (2011). Regulation of blood flow in the microcirculation: role of conducted vasodilation. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 202(3), 271–284.

- <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02244.x>
- Balcells M. Aspectos históricos. A Grau-Olivares M i Arboix A. Deterioro cognitivo de tipo vascular. Madrid: Majadahonda; 2009. Ergon; 2009. 1-18.
 - Ballard, C i Howard, (2006). Neuroleptic drugs in dementia: benefits and harm. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(6), 492–500. <https://doi.org/10.1038/nrn1926>
 - Bannai, T et al (2019). Chronic cerebral hypoperfusion shifts the equilibrium of amyloid β oligomers to aggregation-prone species with higher molecular weight. *Scientific Reports*, 9(1), 2827. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39494->
 - Barber, M i Stott, DJ (2004). Validity of the Telephone Interview for Cognitive Status (TICS) in post-stroke subjects. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 19(1), 75–79. <https://doi.org/10.1002/gps.1041>
 - Bartus, RT et al (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science (New York, N.Y.)*, 217(4558), 408–414. <https://doi.org/10.1126/science.704605>
 - Basser, PJ et al (1994). MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophysical Journal*, 66(1), 259–267. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80775-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80775-1)
 - Bell, RD et al (2012). Apolipoprotein e controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature*, 485(7399), 512–516. <https://doi.org/10.1038/nature11087>
 - Ben-Assayag, E et al (2012). Leukoaraiosis is a chronic atherosclerotic disease. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/532141>
 - Berlau, DJ. et al (2009). APOE epsilon2 is associated with intact cognition but increased Alzheimer pathology in the oldest old. *Neurology*, 72(9), 829–834. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000343853.00346.a4>
 - Bermejo-Martin, J et al (2018). Shared Features of Endothelial Dysfunction between Sepsis and Its Preceding Risk Factors (Aging and Chronic Disease). *Journal of Clinical Medicine*, 7(11), 400. <https://doi.org/10.3390/jcm7110400>
 - Bink, DI et al (2013). Mouse models to study the effect of cardiovascular risk factors on brain structure and cognition. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(11), 1666–1684. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.140>

-
- Boehm-Sturm, P et al (2017). Neuroimaging Biomarkers Predict Brain Structural Connectivity Change in a Mouse Model of Vascular Cognitive Impairment. *Stroke*, 48(2), 468–475. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.014394>
 - Bolaños, JP (2016). Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *Journal of Neurochemistry*, 139 Suppl(Suppl Suppl 2), 115–125. <https://doi.org/10.1111/jnc.13486>
 - Bonetto, A et al (2015). Assessment of muscle mass and strength in mice. *BoneKEy Reports*, 4(February), 1–10. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2015.101>
 - Bos, D et al (2018). Cerebral small vessel disease and the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis of population-based evidence. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 14(11), 1482–1492. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.04.007>
 - Bosomtwi, A et al (2011). Mean microvessel segment length and radius after embolic stroke: Comparison of magnetic resonance imaging (MRI) and laser scanning confocal microscopy (LSCM). *Brain Research*, 1381, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.009>
 - Bourgeois, J et al., (2014). One-year evolution of sleep quality in older users of benzodiazepines: a longitudinal cohort study in belgian nursing home residents. *Drugs & Aging*, 31(9), 677–682. <https://doi.org/10.1007/s40266-014-0203-3>
 - Boxerman, JL et al (1995). MR contrast due to intravascular magnetic susceptibility perturbations. *Magnetic Resonance in Medicine*, 34(4), 555–566. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910340412>
 - Brown, WR et al (2002). Venous collagenosis and arteriolar tortuosity in leukoaraiosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 203–204, 159–163. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(02\)00283-6](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(02)00283-6)
 - Bu, G. (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(5), 333–344. <https://doi.org/10.1038/nrn2620>
 - Budde, MD et al (2009). Axial diffusivity is the primary correlate of axonal injury in the experimental autoimmune encephalomyelitis spinal cord: a quantitative pixelwise analysis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the*

- Society for Neuroscience*, 29(9), 2805–2813.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4605-08.2009>
- Butterfield, DA i Pocernich, CB (2003). The glutamatergic system and Alzheimer’s disease: therapeutic implications. *CNS Drugs*, 17(9), 641–652.
<https://doi.org/10.2165/00023210-200317090-00004>
- Camici, GG et al (2015). Molecular mechanism of endothelial and vascular aging: implications for cardiovascular disease. *European Heart Journal*, 36(48), 3392–3403. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv587>
- Cannistraro, RJ et al (2019). CNS small vessel disease: A clinical review. *Neurology*, 92(24), 1146–1156.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007654>
- Cardillo, C et al (2000). Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension*, 35(6), 1237–1241. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.35.6.1237>
- Cavalieri, M et al (2012). B vitamins and magnetic resonance imaging-detected ischemic brain lesions in patients with recent transient ischemic attack or stroke: the VITamins TO Prevent Stroke (VITATOPS) MRI-substudy. *Stroke*, 43(12), 3266–3270. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.665703>
- Celle, S et al (2012). Association between ambulatory 24-hour blood pressure levels and brain volume reduction: a cross-sectional elderly population-based study. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 60(5), 1324–1331.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.193409>
- Cha, S et al (2003). Dynamic, contrast-enhanced perfusion MRI in mouse gliomas: correlation with histopathology. *Magnetic Resonance in Medicine*, 49(5), 848–855. <https://doi.org/10.1002/mrm.10446>
- Chen, BR et al (2014). A critical role for the vascular endothelium in functional neurovascular coupling in the brain. *Journal of the American Heart Association*, 3(3), 1–14. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.000787>
- Chenoweth, L et al (2009). Caring for Aged Dementia Care Resident Study (CADRES) of person-centred care, dementia-care mapping, and usual care in dementia: a cluster-randomised trial. *The Lancet. Neurology*, 8(4), 317–325.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70045-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70045-6)

-
- Chopard, R et al (2018). Dementia and Atrial Fibrillation: Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Implications. *The American Journal of Medicine*, 131(12), 1408–1417. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.06.035>
 - Cohen-Mansfield, J et al (2015). Interventions for older persons reporting memory difficulties: a randomized controlled pilot study. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 30(5), 478–486. <https://doi.org/10.1002/gps.4164>
 - Colloby, SJ et al (2020). Cortical thinning in dementia with Lewy bodies and Parkinson disease dementia. 54(6). <https://doi.org/10.1177/0004867419885165>
 - Coupland, C et al (2011). Antidepressant use and risk of adverse outcomes in older people: population based cohort study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 343, d4551. <https://doi.org/10.1136/bmj.d4551>
 - Csiszar, A et al (2002). Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circulation Research*, 90(11), 1159–1166. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000020401.61826.EA>
 - Cummings, JL (1993). Frontal-subcortical circuits and human behavior. *Archives of Neurology*, 50(8), 873–880. <https://doi.org/10.1001/archneur.1993.00540080076020>
 - Cunningham EL et al (2015). Dementia. *Ulster Med J*, 84(April), 79–87.
 - Davalos, D i Akassoglou, K. (2012). Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology*, 34(1), 43–62. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0290-8>
 - De Bruijn, RF et al (2015). Association Between Atrial Fibrillation and Dementia in the General Population. *JAMA Neurology*, 72(11), 1288–1294. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.2161>
 - De Leeuw, FE et al (2001). Prevalence of cerebral white matter lesions in elderly people: a population based magnetic resonance imaging study. The Rotterdam Scan Study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 70(1), 9–14. <https://doi.org/10.1136/jnnp.70.1.9>
 - De Silva, TM i Faraci, FM (2012). Effects of angiotensin II on the cerebral circulation: role of oxidative stress. *Frontiers in Physiology*, 3, 484. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00484>
 - Demarin, V et al (2012). Carotid artery disease and cognitive impairment. *Journal*

- of the Neurological Sciences*, 322(1–2), 107–111.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.07.008>
- Dening, T i Sandilyan, MB (2015). Dementia: definitions and types. *Nursing Standard (Royal College of Nursing (Great Britain): 1987)*, 29(37), 37–42.
<https://doi.org/10.7748/ns.29.37.37.e9405>
- Dennie, J et al (1998). NMR imaging of changes in vascular morphology due to tumor angiogenesis. *Magnetic Resonance in Medicine*, 40(6), 793–799.
<https://doi.org/10.1002/mrm.1910400602>
- Deschenes, MR et al (2010). Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers. *Experimental Gerontology*, 45(5), 389–393. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.007>
- Desouza, DD et al (2016). Structural magnetic resonance imaging can identify trigeminal system abnormalities in classical trigeminal neuralgia. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10(OCT), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00095>
- Di Marco, LY et al (2015). Vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer’s disease - A review of endothelium-mediated mechanisms and ensuing vicious circles. *Neurobiology of Disease*, 82, 593–606.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.014>
- Dichgans, M i Leys, D (2017). Vascular Cognitive Impairment. *Circulation Research*, 120(3), 573–591. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308426>
- Dickerson, BC et al (2009). The cortical signature of Alzheimer’s disease: regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 19(3), 497–510.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhn113>
- Dickie, DA et al (2020). *Cortical thickness , white matter hyperintensities , and cognition after stroke*. 15(1), 46–54.
<https://doi.org/10.1177/1747493019851291>
- Donato, AJ et al (2009). Vascular endothelial dysfunction with aging: Endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 297(1).
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00689.2008>

-
- Dong, YF et al (2011). Attenuation of brain damage and cognitive impairment by direct renin inhibition in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 58(4), 635–642. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.173534>
 - Donnan, GA et al (2008). Stroke. *Lancet (London, England)*, 371(9624), 1612–1623. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60694-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60694-7)
 - Drake, C. T i ladecola, C (2007). The role of neuronal signaling in controlling cerebral blood flow. *Brain and Language*, 102(2), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.bandl.2006.08.002>
 - Duca, L et al (2016). Matrix ageing and vascular impacts: Focus on elastin fragmentation. *Cardiovascular Research*, 110(3), 298–308. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw061>
 - Duncombe, J et al (2017). Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 131(19), 2451–2468. <https://doi.org/10.1042/CS20160727>
 - Dybas, et al (2020). Age-related and atherosclerosis-related erythropathy in ApoE/LDLR^{-/-} mice. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(12), 165972. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165972>
 - Elahi, FM i Miller, BL (2017). A clinicopathological approach to the diagnosis of dementia. *Nature Reviews Neurology*, 13(8), 457–476. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.96>
 - Elias, MF et al (2012). Hypertension and cognitive functioning: a perspective in historical context. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 60(2), 260–268. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.186429>
 - Emini Veseli, B et al (2017). Animal models of atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*, 816(May), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.010>
 - Ertürk, A et al (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nature Protocols*, 7(11), 1983–1995. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.119>

- Escobales, N i Crespo, MJ (2005). Oxidative-nitrosative stress in hypertension. *Current Vascular Pharmacology*, 3(3), 231–246. <https://doi.org/10.2174/1570161054368643>
- Ewald, CY et al (2015). Dauer-independent insulin/IGF-1-signalling implicates collagen remodelling in longevity. *Nature*, 519(7541), 97–101. <https://doi.org/10.1038/nature14021>
- Faraci, FM (2005). Oxidative stress: The curse that underlies cerebral vascular dysfunction? *Stroke*, 36(2), 186–188. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000153067.27288.8b>
- Faraci, FM. et al (2004). Regulation of the cerebral circulation: Role of endothelium and potassium channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(5), 53–97. <https://doi.org/10.1038/nrn1387>
- Faraco, G i Iadecola, C (2013). Hypertension: A harbinger of stroke and dementia. *Hypertension*, 62(5), 810–817. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01063>
- Farrer, LA et al (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*, 278(16), 1349–1356.
- Fernandez-Fernandez, S et al (2012). Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *The Biochemical Journal*, 443(1), 3–11. <https://doi.org/10.1042/BJ20111943>
- Filippi, M et al (2012). EFNS task force: the use of neuroimaging in the diagnosis of dementia. *European Journal of Neurology*, 19(12), e131-40, 1487–1501. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2012.03859.x>
- Folstein, MF et al (1975). 'Mini-mental state'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*, 12(3), 189–198. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6)
- Foster, NL et al (2007). FDG-PET improves accuracy in distinguishing frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 130(Pt 10), 2616–2635. <https://doi.org/10.1093/brain/awm177>
- Füchtemeier, M et al (2015). Vascular change and opposing effects of the

- angiotensin type 2 receptor in a mouse model of vascular cognitive impairment. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(3), 476–484. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.221>
- Gallart, PV. (2014). Angiografía por resonancia magnética: técnica y aplicaciones en el estudio de la estenosis de carótida. *Imagen Diagn*, 5(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.imadi.2013.10.002>
- Gamba, P et al (2019). A crosstalk between brain cholesterol oxidation and glucose metabolism in Alzheimer’s disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00556>
- Genina, EA et al (2010). Tissue optical immersion clearing. *Expert Review of Medical Devices*, 7(6), 825–842. <https://doi.org/10.1586/erd.10.50>
- Genis, I. et al (1995). Phosphorylation of tau in apolipoprotein E-deficient mice. *Neuroscience Letters*, 199(1), 5–8. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12007-q](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12007-q)
- Gonzalez, MA i Selwyn, AP (2003). Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *The American Journal of Medicine*, 115 Suppl, 99S-106S. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2003.09.016>
- Gopalan, Y et al (2014). Clinical investigation of the protective effects of palm vitamin E tocotrienols on brain white matter. *Stroke*, 45(5), 1422–1428. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.004449>
- Gordon, GR et al (2007). Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*, 55(12), 1214–1221. <https://doi.org/10.1002/glia.20543>
- 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(9), 2672–2713. <https://doi.org/10.1161/STR.0b013e3182299496>
- Goyal, P. (2005). Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten Dual function of LIMK2 in endothelial cells Dissertation Pankaj Goyal aus. (*Unpublished Doctoral Dissertation*). University of Munich, Germany, 5(September). Retrieved from <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/4129/>

- Gray, VL et al (2020). Asymptomatic carotid stenosis is associated with mobility and cognitive dysfunction and heightens falls in older adults. *Journal of Vascular Surgery*, 71(6), 1930–1937. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2019.09.02>
- Greenamyre, JT et al (1988). Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 12(4), 421–430. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(88\)90102-9](https://doi.org/10.1016/0278-5846(88)90102-9)
- Gruber, B et al (2018). RF coils: A practical guide for nonphysicists. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 48(3), 590–604. <https://doi.org/10.1002/jmri.26187>
- Hainsworth, AH i Markus, HS (2008). Do in vivo experimental models reflect human cerebral small vessel disease? A systematic review. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(12), 1877–1891. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.91>
- Halassa, MM. et al (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 13(2), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.12.005>
- Hanisch, UK (2013). Proteins in microglial activation--inputs and outputs by subsets. *Current Protein & Peptide Science*, 14(1), 3–15. <https://doi.org/10.2174/1389203711314010003>
- Hanson, LG (2008). Is Quantum Mechanics Necessary for Understanding Magnetic Resonance? *Concepts Magn. Reson*, Vol. 32A(5(July), 329–340. <https://doi.org/10.1002/cmr.a>
- Hansson, O et al (2006). Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *The Lancet. Neurology*, 5(3), 228–234. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70355-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70355-6)
- Harris, JJ i Attwell, D (2012). The energetics of CNS white matter. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(1), 356–371. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3430-11.2012>
- Harvey, A et al (2016). Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *The Canadian Journal of Cardiology*,

- 32(5), 659–668. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.02.070>
- Hattori, Y et al (2015). A novel mouse model of subcortical infarcts with dementia. *Journal of Neuroscience*, 35(9), 3915–3928. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3970-14.2015>
- Hattori, Y et al (2014). A novel mouse model of ischemic carotid artery disease. *PLoS ONE*, 9(6), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100257>
- Hattori, Y et al. (2014). Silent information regulator 2 homolog 1 counters cerebral hypoperfusion injury by deacetylating endothelial nitric oxide synthase. *Stroke*, 45(11), 3403–3411. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.006265>
- Hébert, F et al (2013). Cortical atrophy and hypoperfusion in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging*, 34(6), 1644–1652. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.022>
- Hepple, RT i Rice, CL (2016). Innervation and neuromuscular control in ageing skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 594(8), 1965–1978. <https://doi.org/10.1113/JP270561>
- Hermier, M et al (2001). MRI of acute post-ischemic cerebral hemorrhage in stroke patients: diagnosis with T2*-weighted gradient-echo sequences. *Neuroradiology*, 43(10), 809–815. <https://doi.org/10.1007/s002340100601>
- Herz, J i Beffert, U (2000). Apolipoprotein E receptors: Linking brain development and alzheimer’s disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(1), 51–58. <https://doi.org/10.1038/35036221>
- Hiesberger, T et al (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*, 24(2), 481–489. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80861-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80861-2)
- Holland, PR et al (2011). MRI is a sensitive marker of subtle white matter pathology in hypoperfused mice. *Neurobiology of Aging*, 32(12), 2325.e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.11.009>
- Holland, PR et al (2015). Gliovascular disruption and cognitive deficits in a mouse model with features of small vessel disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(6), 1005–1014. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.12>

- Honjo, K et al (2012). Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and the β -amyloid cascade. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 39(6), 712–728. <https://doi.org/10.1017/s0317167100015547>
- Hossmann, KA (2006). Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(7–8), 1057–1083. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9008-1>
- Howard, R et al (2012). Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 366(10), 893–903. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106668>
- Howard, R et al (2015). Nursing home placement in the Donepezil and Memantine in Moderate to Severe Alzheimer's Disease (DOMINO-AD) trial: secondary and post-hoc analyses. *The Lancet. Neurology*, 14(12), 1171–1181. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00258-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00258-6)
- Hunter, JM et al (2012). Morphological and pathological evolution of the brain microcirculation in aging and Alzheimer's disease. *PloS One*, 7(5), e36893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036893>
- Iadecola, C (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(5), 347–360. <https://doi.org/10.1038/nrn1387>
- Iadecola, C (2013). The Pathobiology of Vascular Dementia. *Neuron*, 80(4), 844–866. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.008>
- Iadecola, C (2014). Hypertension and dementia. *Hypertension*, 64(1), 3–5. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03040>
- Iadecola, C i Anrather, J (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature Medicine*, 17(7), 796–808. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>
- Ielacqua, GD et al (2016). Magnetic resonance Q mapping reveals a decrease in microvessel density in the arca β mouse model of cerebral amyloidosis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(JAN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00241>
- Ikram, MA et al (2017). Genetics of vascular dementia - review from the ICVD working group. *BMC Medicine*, 15(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0813-9>

-
- Imanishi, M et al (2014). Smooth muscle cell-specific Hif-1 α deficiency suppresses angiotensin II-induced vascular remodelling in mice. *Cardiovascular Research*, 102(3), 460–468. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu061>
 - Ishibashi, S et al (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of Clinical Investigation*, 92(2), 883–893. <https://doi.org/10.1172/JCI116663>
 - Ishibashi, S et al (1994). The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in ‘knockout’ mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), 4431–4435. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4431>
 - Ishii, K (2020). Diagnostic imaging of dementia with Lewy bodies, frontotemporal lobar degeneration, and normal pressure hydrocephalus. *Japanese Journal of Radiology*, 38(1), 64–76. <https://doi.org/10.1007/s11604-019-00881-9>
 - Javanshiri, K et al (2018). Atherosclerosis, Hypertension, and Diabetes in Alzheimer’s Disease, Vascular Dementia, and Mixed Dementia: Prevalence and Presentation. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 65, 1247–1258. <https://doi.org/10.3233/JAD-180644>
 - Jawień, J et al. (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 55(3), 503–517.
 - Jellinger, KA (2006). Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 113(11), 1603–1623. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0578-3>
 - Jensen, JH i Chandra, R. (2000). MR imaging of microvasculature. *Magnetic Resonance in Medicine*, 44(2), 224–230. [https://doi.org/10.1002/1522-2594\(200008\)44:2<224::aid-mrm9>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1522-2594(200008)44:2<224::aid-mrm9>3.0.co;2-m)
 - Johanson, CE et al (2011). The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 686, 101–131. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3_4
 - Johnson, NA et al (2005). Pattern of cerebral hypoperfusion in Alzheimer disease

- and mild cognitive impairment measured with arterial spin-labeling MR imaging: initial experience. *Radiology*, 234(3), 851–859. <https://doi.org/10.1148/radiol.2343040197>
- Jones, SE et al (2019). Neuropsychologia Relationship between cortical thickness and fluency in the memory disorders clinic population. *Neuropsychologia*, 129(July 2018), 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2019.03.021>
- Juma, WM et al (2011). C-reactive protein expression in a rodent model of chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Research*, 1414, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.07.047>
- Kalaria, RN (2016). Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathologica*, 131(5), 659–685. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1571-z>
- Kalaria, RN (2018). The pathology and pathophysiology of vascular dementia. *Neuropharmacology*, 134, 226–239. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.12.030>
- Kalaria, RN et al (2004). Towards defining the neuropathological substrates of vascular dementia. *Journal of the Neurological Sciences*, 226(1-2 SPEC.ISS.), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.09.019>
- Kalaria, R. N i Mukaetova-Ladinska, EB (2012). Delirium, dementia and senility. *Brain: A Journal of Neurology*, 135(Pt 9), 2582–2584. <https://doi.org/10.1093/brain/aws235>
- Kang, C. et al (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science*, 349(6255). <https://doi.org/10.1126/science.aaa5612>
- Kapasi, A et al (2017). Impact of multiple pathologies on the threshold for clinically overt dementia. *Acta Neuropathologica*, 134(2), 171–186. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1717-7>
- Kazumata, K et al (2020). Combined structural and diffusion tensor imaging detection of ischemic injury in moyamoya disease: relation to disease advancement and cerebral hypoperfusion. *Journal of Neurosurgery*, 134(4),

- 1155–1164. <https://doi.org/10.3171/2020.1.JNS193260>
- Keeling, RM et al (2007). Weekly oral prednisolone improves survival and strength in male mdx mice. *Muscle & Nerve*, 35(1), 43–48. <https://doi.org/10.1002/mus.20646>
 - Kisler, K et al (2017). Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(7), 419–434. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.48>
 - Kleibeuker, EA et al (2012). Combining angiogenesis inhibition and radiotherapy: a double-edged sword. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 15(3), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2012.04.002>
 - Knopman, DS et al (2001). Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 56(9), 1143–1153. <https://doi.org/10.1212/wnl.56.9.1143>
 - Kochanek, KD et al (2016). Deaths: Final Data for 2014. *National Vital Statistics Reports : From the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*, 65(4), 1–122.
 - Koizumi, K et al (2018). Apoε4 disrupts neurovascular regulation and undermines white matter integrity and cognitive function. *Nature Communications*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06301-2>
 - Kubik, LL i Philbert, MA (2015). The role of astrocyte mitochondria in differential regional susceptibility to environmental neurotoxicants: tools for understanding neurodegeneration. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 144(1), 7–16. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu254>
 - Kucharska-Newton, AM et al (2019). Determinants of vascular age: An epidemiological perspective. *Clinical Chemistry*, 65(1), 108–118. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.287623>
 - Le Bihan, D (2003). Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(6), 469–480. <https://doi.org/10.1038/nrn1119>
 - Leckie, RL et al (2014). BDNF mediates improvements in executive function

- following a 1-year exercise intervention. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8, 985. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00985>
- Lee, ES et al (2019). A mouse model of subcortical vascular dementia reflecting degeneration of cerebral white matter and microcirculation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39(1), 44–57. <https://doi.org/10.1177/0271678X17736963>
- Lee, S et al (2011). UK stroke incidence, mortality and cardiovascular risk management 1999–2008: time-trend analysis from the General Practice Research Database. *BMJ Open*, 1(2), e000269. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2011-000269>
- Lerch, JP et al (2008). Cortical thickness measured from MRI in the YAC128 mouse model of Huntington’s disease. *NeuroImage*, 41(2), 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.02.019>
- Li, Y. et al (2018). Aging-associated changes in cerebral vasculature and blood flow as determined by quantitative optical coherence tomography angiography. *Neurobiology of Aging*, 70, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.017>
- Lin, AL et al (2020). APOE genotype-dependent pharmacogenetic responses to rapamycin for preventing Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Disease*, 139(December 2019), 104834. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104834>
- Liu, CC et al (2013). Apolipoprotein e and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology*, 9(2), 106–118. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>
- Love, S i Miners, JS (2016). Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathologica*, 131(5), 645–658. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1522-0>
- Lugo-Hernandez, E. et al (2017). 3D visualization and quantification of microvessels in the whole ischemic mouse brain using solvent-based clearing and light sheet microscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(10), 3355–3367. <https://doi.org/10.1177/0271678X17698970>
- Mahley, RW (2016). Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *Journal of Molecular Medicine*, 94(7), 739–746.

- <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1427-y>
- Masdeu, JC Pascual, B (2008). Neuroimaging of disorders leading to dementia. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 8(6), 443–444. <https://doi.org/10.1007/s11910-008-0069-z>
 - Masliah, E et al (1995). Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Experimental Neurology*, 136(2), 107–122. <https://doi.org/10.1006/exnr.1995.1088>
 - Matthews, FE et al. (2016). A two decade dementia incidence comparison from the Cognitive Function and Ageing Studies I and II. *Nature Communications*, 7, 11398. <https://doi.org/10.1038/ncomms11398>
 - Maust, DT et al (2015). Antipsychotics, other psychotropics, and the risk of death in patients with dementia: number needed to harm. *JAMA Psychiatry*, 72(5), 438–445. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.3018>
 - McGuinness, B et al (2009). Blood pressure lowering in patients without prior cerebrovascular disease for prevention of cognitive impairment and dementia. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4), CD004034. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004034.pub3>
 - Mestre, H et al (2017). Perivascular spaces, glymphatic dysfunction, and small vessel disease. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 131(17), 2257–2274. <https://doi.org/10.1042/CS20160381>
 - Metacohorts for the study of vascular disease and its contribution to cognitive decline and neurodegeneration: An initiative of the Joint Programme for Neurodegenerative Disease Research. (2016). *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 12(12), 1235–1249. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.06.004>
 - Michel, P i Chantal, R (2015). *Imaging the Microvessel Caliber and Density : Principles and Applications of Microvascular MRI*. 341(April 2014), 325–341. <https://doi.org/10.1002/mrm.25396>
 - Miyazaki, M i Lee, VS (2008). Nonenhanced MR angiography. *Radiology*, 248(1), 20–43. <https://doi.org/10.1148/radiol.2481071497>
 - Montagne, A et al (2018). Pericyte degeneration causes white matter dysfunction in the mouse central nervous system. *Nature Medicine*, 24(3), 326–

337. <https://doi.org/10.1038/nm.4482>
- Müller, MJ et al (2005). Functional implications of hippocampal volume and diffusivity in mild cognitive impairment. *NeuroImage*, 28(4), 1033–1042. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.06.029>
 - Muñoz-Moreno, E et al (2018). Early brain connectivity alterations and cognitive impairment in a rat model of Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Research & Therapy*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0346-2>
 - Muoio, V et al (2014). The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 210(4), 790–798. <https://doi.org/10.1111/apha.12250>
 - Nagata, K et al (2007). Clinical diagnosis of vascular dementia. *Journal of the Neurological Sciences*, 257(1–2), 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.01.049>
 - Nagata, K et al (2016). Cerebral circulation in aging. *Ageing Research Reviews*, 30, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.001>
 - Nasrabady, SE et al (2018). White matter changes in Alzheimer’s disease: a focus on myelin and oligodendrocytes. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0515-3>
 - Nasreddine, ZS et al (2005). The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society*, 53(4), 695–699. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x>
 - Nathan, BP et al (2010). Reconstitution of the olfactory epithelium following injury in apoE-deficient mice. *Experimental Neurology*, 226(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.08.001>
 - Ndrepepa, G et al (2016). Association of progression or regression of coronary artery atherosclerosis with long-term prognosis. *American Heart Journal*, 177, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2016.03.016>
 - Nikolakopoulou, AM et al (2019). Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss. *Nature Neuroscience*, 22(7), 1089–1098. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0434-z>
 - Nishino, A et al (2016). Long-term effects of cerebral hypoperfusion on neural density and function using misery perfusion animal model. *Scientific Reports*, 6, 25072. <https://doi.org/10.1038/srep25072>

-
- Nishio, K et al (2010). A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke*, 41(6), 1278–1284. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.581686>
 - O'Donnell, MJ et al (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet (London, England)*, 376(9735), 112–123. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60834-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60834-3)
 - O'Sullivan, M et al (2004). Diffusion tensor MRI correlates with executive dysfunction in patients with ischaemic leukoaraiosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 75(3), 441–447. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.014910>
 - O'Sullivan, M (2008). Leukoaraiosis. *Practical Neurology*, 8(1), 26–38. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.139428>
 - Pantoni, L (2010). Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet. Neurology*, 9(7), 689–701. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70104-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70104-6)
 - Park, L et al (2007). Nox2-derived reactive oxygen species mediate neurovascular dysregulation in the aging mouse brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(12), 1908–1918. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600491>
 - Park, L et al (2013). Innate immunity receptor CD36 promotes cerebral amyloid angiopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8), 3089–3094. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300021110>
 - Partecke, IL et al (2011). In vivo imaging of pancreatic tumours and liver metastases using 7 Tesla MRI in a murine orthotopic pancreatic cancer model and a liver metastases model. *BMC Cancer*, 11(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-40>
 - Peppiatt, CM et al (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 443(7112), 700–704. <https://doi.org/10.1038/nature05193>
 - Petcu, EB et al (2010). Angiogenesis in old-aged subjects after ischemic stroke: A cautionary note for investigators. *Journal of Angiogenesis Research*, 2(1), 26. <https://doi.org/10.1186/2040-2384-2-26>

- Pfefferbaum, A et al (2000). Age-related decline in brain white matter anisotropy measured with spatially corrected echo-planar diffusion tensor imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 44(2), 259–268. [https://doi.org/10.1002/1522-2594\(200008\)44:2<259::aid-mrm13>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/1522-2594(200008)44:2<259::aid-mrm13>3.0.co;2-6)
- Phelps, ME (2000). Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 9226–9233. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.9226>
- Plump, AS et al (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71(2), 343–353. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90362-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90362-g)
- Plump, AS i Lum, PY (2009). Genomics and cardiovascular drug development. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(13), 1089–1100. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.11.050>
- Podcasy, JL i Epperson, CN (2016). Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(4), 437–446.
- Posse de Chaves, E i Narayanaswami, V (2008). Apolipoprotein E and cholesterol in aging and disease in the brain. *Future Lipidol*, Oct;3(5), 505–530. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.116>
- Prencipe, M et al (1997). Stroke, disability, and dementia: results of a population survey. *Stroke*, 28(3), 531–536. <https://doi.org/10.1161/01.str.28.3.531>
- Prestia, A et al (2010). Cortical changes in incipient Alzheimer’s disease. *Journal of Alzheimer’s Disease : JAD*, 22(4), 1339–1349. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101191>
- Prut, L i Belzung, C (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01272-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272-x)
- Qiu, L et al (2016). Chronic cerebral hypoperfusion enhances Tau hyperphosphorylation and reduces autophagy in Alzheimer’s disease mice. *Scientific Reports*, 6, 23964. <https://doi.org/10.1038/srep23964>
- Raber, J et al (2002). Androgens Protect against Apolipoprotein E4-Induced Cognitive Deficits. *Journal of Neuroscience*, 22(12), 5204–5209.

- <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-12-05204.2002>
- Racine, AM et al (2018). The personalized Alzheimer's disease cortical thickness index predicts likely pathology and clinical progression in mild cognitive impairment. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, 10, 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2018.02.007>
 - Radiü, B et al (2019). EEG analysis and SPECT imaging in Alzheimer's disease, vascular dementia and mild cognitive impairment. *Psychiatria Danubina*, 31(1), 111–115. <https://doi.org/10.24869/psyd.2019.111>
 - Raz, L et al (2016). The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(1), 172–186. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.164>
 - Redmond, SA et al (2016). Somatodendritic Expression of JAM2 Inhibits Oligodendrocyte Myelination. *Neuron*, 91(4), 824–836. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.07.021>
 - Redolfi, A et al (2015). Head-to-head comparison of two popular cortical thickness extraction algorithms: a cross-sectional and longitudinal study. *PLoS One*, 10(3), e0117692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117692>
 - Reijnders, J et al (2013). Cognitive interventions in healthy older adults and people with mild cognitive impairment: a systematic review. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.07.003>
 - Riedl, KA et al (2020). Wall shear stress analysis using 17.6 Tesla MRI: A longitudinal study in ApoE^{-/-} mice with histological analysis. *PLoS ONE*, 15(8 august), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238112>
 - Rigau, V et al (2007). Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain : A Journal of Neurology*, 130(Pt 7), 1942–1956. <https://doi.org/10.1093/brain/awm118>
 - Román, G i Pascual, B (2012). Contribution of Neuroimaging to the Diagnosis of Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Archives of Medical Research*, 43(8), 671–676. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.10.018>
 - Ross, R (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, 340(2), 115–126. <https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207>

- Rothwell, PM et al (2004). Change in stroke incidence, mortality, case-fatality, severity, and risk factors in Oxfordshire, UK from 1981 to 2004 (Oxford Vascular Study). *Lancet (London, England)*, 363(9425), 1925–1933. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16405-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16405-2)
- Rothwell, PM et al (2011). Medical treatment in acute and long-term secondary prevention after transient ischaemic attack and ischaemic stroke. *Lancet (London, England)*, 377(9778), 1681–1692. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60516-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60516-3)
- Ruitenberg, A et al (2005). Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: the Rotterdam Study. *Annals of Neurology*, 57(6), 789–794. <https://doi.org/10.1002/ana.20493>
- Samson, AL et al (2015). MouseMove: An open source program for semi-automated analysis of movement and cognitive testing in rodents. *Scientific Reports*, 5(November), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep16171>
- Schaapsmeeders, P et al (2013). Long-term cognitive impairment after first-ever ischemic stroke in young adults. *Stroke*, 44(6), 1621–1628. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.000792>
- Schager, B i Brown, CE (2020). Susceptibility to capillary plugging can predict brain region specific vessel loss with aging. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 40(12), 2475–2490. <https://doi.org/10.1177/0271678X19895245>
- Schmitt, S et al (2015). Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851(8), 999–1005. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2014.12.016>
- Scuteri, A et al (2011). Microvascular brain damage with aging and hypertension: pathophysiological consideration and clinical implications. *Journal of Hypertension*, 29(8), 1469–1477. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328347cc17>
- Seevinck, PR et al (2010). Magnetic resonance imaging of brain angiogenesis after stroke. *Angiogenesis*, 13(2), 101–111. <https://doi.org/10.1007/s10456-010-9174-0>

-
- Selkoe, DJ (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*, 399(6738 Suppl), A23-31. <https://doi.org/10.1038/399a023>
 - Seo, HS et al (1997). Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein e-deficient mice: Potential roles of lipid deposition, medial atrophy, and adventitial inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(12), 3593–3601. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.12.3593>
 - Shabir, O et al (2018). Neurovascular dysfunction in vascular dementia, Alzheimer's and atherosclerosis. *BMC Neuroscience*, 19(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0465-5>
 - Shang, J et al (2016). Strong Impact of Chronic Cerebral Hypoperfusion on Neurovascular Unit, Cerebrovascular Remodeling, and Neurovascular Trophic Coupling in Alzheimer's Disease Model Mouse. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 52(1), 113–126. <https://doi.org/10.3233/JAD-151126>
 - Shibata, M et al (2007). Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*, 38(10), 2826–2832. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.490151>
 - Sinha, S et al (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*, 402(6761), 537–540. <https://doi.org/10.1038/990114>
 - Skoog, et al (1996). 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet (London, England)*, 347(9009), 1141–1145. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)90608-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)90608-x)
 - Sofroniew, MV (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638–647. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>
 - Somredngan, S Thong-asa, W (2017). Neurological Changes in Vulnerable Brain Areas of Chronic Cerebral Hypoperfusion Mice. *Annals of Neurosciences*, 10900, 233–242. <https://doi.org/10.1159/000481789>
 - Song, SK et al (2005). Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *NeuroImage*, 26(1), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.01.028>

- Soria, G et al (2013). The Ins and Outs of the BCCAO Model for Chronic Hypoperfusion: A Multimodal and Longitudinal MRI Approach. *PLoS ONE*, 8(9), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074631>
- Sowell, ER et al (2003). Mapping cortical change across the human life span. *Nature Neuroscience*, 6(3), 309–315. <https://doi.org/10.1038/nn1008>
- Spring, S et al (2007). Sexual dimorphism revealed in the structure of the mouse brain using three-dimensional magnetic resonance imaging. *NeuroImage*, 35(4), 1424–1433. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.02.023>
- Srinivasan, V et al (2016). Genetic and environmental factors in vascular dementia: An update of blood brain barrier dysfunction. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(5), 515–521. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12558>
- Steinfeld, K et al (2018). Low testosterone in ApoE/LDL receptor double-knockout mice is associated with rarefied testicular capillaries together with fewer and smaller Leydig cells. *Scientific Reports*, 8(1), 5424. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23631-9>
- Struys, T et al (2016). In vivo evidence for long-term vascular remodeling resulting from chronic cerebral hypoperfusion in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(2), 726–739. <https://doi.org/10.1177/0271678X16638349>
- Sundström, A et al (2016). Marital status and risk of dementia: a nationwide population-based prospective study from Sweden. *BMJ Open*, 6(1), e008565. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-008565>
- Sung, H et al (2012). A group music intervention using percussion instruments with familiar music to reduce anxiety and agitation of institutionalized older adults with dementia. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 27(6), 621–627. <https://doi.org/10.1002/gps.2761>
- Swiger et al (2014). Narrowing sex differences in lipoprotein cholesterol subclasses following mid-life: the very large database of lipids (VLDL-10B). *Journal of the American Heart Association*, 3(2), 1–10. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.000851>
- Tang et al 2005. (2008). Age-related defects in sensorimotor activity, spatial

- learning and memory in C57Bl/6 mice. NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1097/ANA.0b013e3181d56c98>.
- Tarantini, S et al (2017). Impaired neurovascular coupling in aging and Alzheimer’s disease: Contribution of astrocyte dysfunction and endothelial impairment to cognitive decline. *Experimental Gerontology*, 94, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.11.004>
 - Tarumi, T i Zhang, R (2018). Cerebral blood flow in normal aging adults: cardiovascular determinants, clinical implications, and aerobic fitness. *Journal of Neurochemistry*, 144(5), 595–608. <https://doi.org/10.1111/jnc.14234>
 - Taylor, EN et al (2020). The brains of aged mice are characterized by altered tissue diffusion properties and cerebral microbleeds. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 277. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02441-6>
 - Ter Telgte, A et al (2018). Cerebral small vessel disease: From a focal to a global perspective. *Nature Reviews Neurology*, 14(7), 387–398. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0014-y>
 - Teri, L et al (2008). Exercise interventions for dementia and cognitive impairment: the Seattle Protocols. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 12(6), 391–394. <https://doi.org/10.1007/bf02982672>
 - Teunissen, CE et al (2002). Biochemical markers related to Alzheimer’s dementia in serum and cerebrospinal fluid. *Neurobiology of Aging*, 23(4), 485–508. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(01\)00328-1](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(01)00328-1)
 - Toth, P et al (2014). Resveratrol treatment rescues neurovascular coupling in aged mice: Role of improved cerebromicrovascular endothelial function and downregulation of NADPH oxidase. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 306(3). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00744.2013>
 - Tsai, CY et al (2019). Baroreflex functionality in the eye of diffusion tensor imaging. *Journal of Physiology*, 597(1), 41–55. <https://doi.org/10.1113/JP277008>
 - Tzourio, C. et al (2014). Is hypertension associated with an accelerated aging of the brain? *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 63(5), 894–903. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.00147>
 - Ungvari, Z et al (2013). Ionizing radiation promotes the acquisition of a

- senescence-associated secretory phenotype and impairs angiogenic capacity in cerebromicrovascular endothelial cells: Role of increased dna damage and decreased dna repair capacity in microvascular radiosens. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 68(12 A), 1443–1457. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt057>
- Ungvari, Z et al (2018). Mechanisms of vascular aging. *Circulation Research*, 123(7), 849–867. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311378>
- Urushihata, T et al (2018). Water Diffusion in the Brain of Chronic Hypoperfusion Model Mice: A Study Considering the Effect of Blood Flow. *Magnetic Resonance in Medical Sciences : MRMS : An Official Journal of Japan Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 17(4), 318–324. <https://doi.org/10.2463/mrms.mp.2017-0149>
- Vagnucci, AH i Li, WW (2003). Alzheimer's disease and angiogenesis. *Lancet*, 361(9357), 605–608. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12521-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12521-4)
- Valenzuela, MJ i Sachdev, P (2006). Brain reserve and dementia: a systematic review. *Psychological Medicine*, 36(4), 441–454. <https://doi.org/10.1017/S0033291705006264>
- Valotassiou, V et al (2012). Perfusion SPECT studies with mapping of Brodmann areas in differentiating Alzheimer's disease from frontotemporal degeneration syndromes. *Nuclear Medicine Communications*, 33(12), 1267–1276. <https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e3283599983>
- Valotassiou, V et al (2015). Clinical Evaluation of Brain Perfusion SPECT with Brodmann Areas Mapping in Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 47(3), 773–785. <https://doi.org/10.3233/JAD-150068>
- Van Der Flier et al (2018). Vascular cognitive impairment. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(Vci), 1–16. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.3>
- Van Der Loo, B et al (2000). Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *Journal of Experimental Medicine*, 192(12), 1731–1743. <https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1731>
- Vance, JE i Hayashi, H (2010). Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(8), 806–818. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2010.02.007>

-
- Villemagne, VL et al (2021). Molecular Imaging Approaches in Dementia. *Radiology*, (6), 200028. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200028>
 - Villeneuve, S et al (2014). Vascular risk and A β interact to reduce cortical thickness in AD vulnerable brain regions. *Neurology*, 83(1), 40–47. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000550>
 - Wardlaw, JM. et al (2013). Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: Insights from neuroimaging. *The Lancet Neurology*, 12(5), 483–497. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70060-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70060-7)
 - Wardlaw, JM et al (2013). Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *The Lancet Neurology*, 12(8), 822–838. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70124-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70124-8)
 - Washida, K et al (2019). Animal Models of Chronic Cerebral Hypoperfusion: From Mouse to Primate. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246176>
 - Wei, M et al (2017). Fasting-mimicking diet and markers/risk factors for aging, diabetes, cancer, and cardiovascular disease. *Science Translational Medicine*, 9(377). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai8700>
 - Werner, CM i Laufs, U (2018). Long-term exposure to high cholesterol accelerates cellular ageing. *European Heart Journal*, 1–3. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy752>
 - WHO. (2001). Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation. *Environmental Health*, 144.
 - Wolters, FJ et al (2017). Cerebral Perfusion and the Risk of Dementia: A Population-Based Study. *Circulation*, 136(8), 719–728. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027448>
 - Wu, EX. et al (2004). High-resolution MR imaging of mouse brain microvasculature using the relaxation rate shift index Q. *NMR in Biomedicine*, 17(7), 507–512. <https://doi.org/10.1002/nbm.921>
 - Wu, YT et al (2016). Dementia in western Europe: Epidemiological evidence and implications for policy making. *The Lancet Neurology*, 15(1), 116–124. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00092-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00092-7)
 - Xu, G et al (2009). Plasma C-reactive protein is related to cognitive deterioration

- and dementia in patients with mild cognitive impairment. *Journal of the Neurological Sciences*, 284(1–2), 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.04.018>
- Xu, Q et al (2006). Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(19), 4985–4994. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5476-05.2006>
- Yang, R et al (1999). Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(11), 2762–2768. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.11.2762>
- Yao, ZY et al (2019). Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation. *Inflammation Research*, 68(10), 815–823. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01269-1>
- Yata, K et al (2014). In vivo imaging of the mouse neurovascular unit under chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*, 45(12), 3698–3703. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005891>
- Yi, S. W., Yi, J. J., & Ohrr, H. (2019). Total cholesterol and all-cause mortality by sex and age: a prospective cohort study among 12.8 million adults. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38461-y>
- Zaccai, J et al (2006). Population-based neuropathological studies of dementia: Design, methods and areas of investigation - A systematic review. *BMC Neurology*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-6-2>
- Zagrajek, MM i Pokryszko-Dragan, A (2005). Charakterystyka i obraz kliniczny leukoarajozy. *Udar Mozgu - Problemy Interdyscyplinarne*, 7(2), 56–60.
- Zahodne, LB et al (2015). Longitudinal relationships between Alzheimer disease progression and psychosis, depressed mood, and agitation/aggression. *The American Journal of Geriatric Psychiatry: Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, 23(2), 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.jagp.2013.03.014>
- Zerbi, V et al (2013). Microvascular cerebral blood volume changes in aging APP^{swe}/PS1^{dE9} AD mouse model: A voxel-wise approach. *Brain Structure and*

- Function*, 218(5), 1085–1098. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0448-8>
- Zerbi, V et al (2014). Resting-state functional connectivity changes in aging apoe4 and apoe-ko mice. *Journal of Neuroscience*, 34(42), 13963–13975. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0684-14.2014>
- Zhang, SH et al (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5081), 468–471. <https://doi.org/10.1126/science.1411543>
- Zhu, S et al (2019). Aging- and obesity-related peri-muscular adipose tissue accelerates muscle atrophy. *PloS One*, 14(8), e0221366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221366>
- Zhuo, M., Holtzman, D. M., Li, Y., Osaka, H., DeMaro, J., Jacquin, M., & Bu, G. (2000). Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(2), 542–549. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-02-00542.2000>
- Zlokovic, BV (2008). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron*, 57(2), 178–201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>
- Zofková, I et al (2002). Apolipoprotein E gene determines serum testosterone and dehydroepiandrosterone levels in postmenopausal women. *European Journal of Endocrinology*, 147(4), 503–506. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1470503>
- Zonta, M et al (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neuroscience*, 6(1), 43–50. <https://doi.org/10.1038/nn980>
- Zubenko, GS i Moossy, J (1988). Major depression in primary dementia. Clinical and neuropathologic correlates. *Archives of Neurology*, 45(11), 1182–1186. <https://doi.org/10.1001/archneur.1988.00520350020008>

