

Informe final publicable de proyecto Doppler ultrarrapido y super-resolución en la evaluación del flujo sanguíneo en pequeños animales: análisis del componente vascular en enfermedades neurodegenerativas.

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_155539

21/08/2023

NEGREIRA CASARES, Carlos Alther (Responsable Técnico - Científico)

CORTELA TIBONI TIBONI, Guillermo Angel (Investigador)

CUITIÑO MENDIBERRY, María Noel (Investigador)

DAMIÁN CABRERA, Juan Pablo (Investigador)

DI TOMASO DI PRATO, María Vittoria (Investigador)

FARIAS COLMAN, Joaquina (Investigador)

GARAY GODOY, Gonzalo Andrés (Investigador)

KUN GONZÁLEZ, Alejandra (Co-Responsable Técnico-Científico)

MORENO GARCÍA, Alexandra (Investigador)

OLIVERA BRAVO, Silvia (Investigador)

RUBIDO OBRER, Nicolás (Investigador)

TANTER, Mickael (Investigador)

VAZQUEZ ALBERDI, Lucia (Investigador)

ANZIBAR FIALHO, Maximiliano (Investigador)

BARANGER, Jerome (Investigador)

BRUM NUÑEZ, Javier (Investigador)

BUDELLI DI PAOLA, Eliana (Investigador)

CALERO LARA, Miguel (Investigador)

CALERO RUEDA, Olga (Investigador)

CANCLINI CASTELLI, Lucía (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\
FACULTAD DE VETERINARIA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA \\
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III \\
PHYSICS FOR MEDICINE PARÍS, INSERM, CNRS, ESPCI, PARIS, FRANCE. \\
MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE" \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

Existen comportamientos hemodinámicos específicos del cerebro que permiten comprender su fisiología y pueden ser considerados indicadores diagnósticos.

La respuesta hemodinámica, manifiesta principalmente en pequeños vasos, no es evaluada con precisión con las herramientas estándar actualmente disponibles.

El principal objetivo de este proyecto fue poner a punto, implementar y optimizar dos novísimas herramientas ultrasónicas de alta precisión para evaluar el flujo sanguíneo cerebral: Doppler ultrarrápido (uDoppler) y Microscopía de Localización Ultrarrápida Ultrasónica (uULM).

Al igual que el Doppler convencional, el uDoppler utiliza a los eritrocitos como elementos difusores del ultrasonido, pero a diferencia de él, uDoppler obtiene imágenes del flujo sanguíneo (CBV) con mucho mayor sensibilidad y resolución. Además, mediante la adquisición de sucesivas imágenes uDoppler, es posible evaluar la respuesta funcional (fUS) de la red cerebrovascular del animal sometido a estímulos externos. En el abordaje uULM, burbujas de hexafluoruro de azufre inyectadas al torrente sanguíneo son mucho más reflectoras al haz ultrasónico produciendo así imágenes de flujo sanguíneo de resolución superior a las obtenidas en el uDoppler.

Utilizando un ecógrafo Verasonics128 Vantage se optimizaron los mecanismos físicos de interacción ultrasonido-tejido, parámetros de emisión-detección, resolución espacio-temporal y algoritmos de adquisición logrando la sensibilidad y resolución necesaria, 100 micras con uDoppler y 10 micras con uULM, que permitieron optimizar la calidad de las imágenes en los modelos murinos utilizados.

Las herramientas ultrasónicas puestas a punto fueron empleadas para estudiar, in vivo, el flujo sanguíneo cerebral y caracterizar la hemodinámica asociada al envejecimiento y a la neurodegeneración, en ratones. Combinamos el abordaje uDoppler con la descripción estructural de los vasos de las mismas secciones del cerebro, mediante microscopía laser confocal de mayor resolución, lo que permitió verificar los resultados uDoppler. Establecimos una segmentación de las distribuciones, que nos permitió un análisis cuantitativo estadísticamente robusto y exhaustivo que asegura la fiabilidad del abordaje.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Físicas / Óptica, Acústica / Física para la Biología y la Medicina
Palabras clave: Doppler-Ultra-Rápido / Microscopía de localización ultra-rápida por ultrasonido / Tr-J, SAMP-8 /

Introducción

Se explicitan los diferentes componentes y aspectos de los antecedentes, abordaje y descripción del proyecto:

1) Doppler Ultrarrápido y super-resolución.

Los comportamientos hemodinámicos específicos en el cerebro son considerados indicadores válidos en el diagnóstico y comprensión de afecciones neurodegenerativas. La resolución del ultrasonido está restringida por la difracción (media longitud de onda), y la opción de aumentar la frecuencia emitida para mejorar la resolución limita la profundidad de inspección. Este hecho no permite a la ecografía Doppler convencional ser suficientemente sensible para imagenología del flujo sanguíneo en pequeños vasos donde la mayor parte de la respuesta hemodinámica se produce.

Como solución se ha propuesto un método ultrasónico de Doppler ultrarrápido (uDoppler) que permite mapear gran parte del volumen de sangre cerebral (CBV) e identificar regiones de actividad hemodinámica específica en respuesta a estímulos externos.

Este método está basado en adquirir imágenes de corte cerebrales a alta cadencia de imágenes (hasta 20 KHz) utilizando como emisión la composición de ondas planas a diferentes ángulos. Los ecos obtenidos para cada ángulo son combinados generando una única imagen a una cadencia de 500 Hz. Se gana un factor 5 en sensibilidad, pero las velocidades del flujo de sangre menores a 4-5 mm/s no se detectan, ni es posible detectar el flujo en muy pequeños vasos.

Inspirándose en el enfoque revolucionario de la microscopía de localización foto-activada por fluorescencia (FPALM), que

logra un aumento de la resolución en más de un orden de magnitud (Nobel de Química) muy recientemente se ha propuesto un nuevo método de imagenología Doppler ultrarrápida con super-resolución llamado uULM (microcopia ultrarrápida de localización por ultrasonidos).

Consiste en localizar y seguir un conjunto disperso de microburbujas (2-3 micras de diámetro) de gas inyectadas en los vasos, reflejando muy bien el sonido, lo que permite lograr un aumento significativo de la resolución espacio-temporal y sensibilidad respecto al uDoppler, permitiendo detectar flujos en micro-vasos (por ej. capilares) hasta de 10 micras de diámetro en cerebros de ratas. Para localizar y seguir las microburbujas se han utilizado soluciones diluidas para distinguirlas individualmente. El equipo de Tanter procedió de otra manera, utilizando el método de uDoppler con su alta cadencia de imágenes que permite detectar las ondas dispersadas por las microburbujas individuales comparando imágenes secuenciales para ubicar el centro de la función de dispersión. Así la señal ecográfica recibida de una microburbuja individual se representa como una función de dispersión de puntos (PSF) del sistema de imágenes. Cada microburbuja está situada en el centro de la PSF, luego con técnicas de interferometría entre muchas imágenes adquiridas a alta velocidad se super-resuelve la localización de cada microburbuja con mejor resolución que para uDoppler (que ya es bastante menor que la que impone la ley de difracción) en decenas de segundos para todo el cerebro. De esta forma si los cambios en el tiempo de las microburbujas son significativos entre los fotogramas, las señales de las mismas pueden detectarse siempre que estos cambios sean lo suficientemente dispersos para asegurar la separación espacial y así poder determinar con precisión posición y velocidad de las mismas.

Varios antecedentes en trabajos relacionados al propuesto (focalización por inversión temporal, imagenología ultrarrápida, nos permitieron muy recientemente comenzar a realizar las primeras experiencias en la región para obtener imágenes uDoppler de cortes coronales de cerebros de ratones con el ecógrafo ultrarrápido Verasonics adquirido en 2018, a partir de estas primeras experiencias se propone poner a punto y optimizar esta técnica de uDoppler y así como la técnica de superresolución (uULM) para su aplicación al estudio de patologías neurodegenerativas en cerebros de ratones.

2) La red vascular en salud y enfermedad

Alteraciones vasculares del cerebro han sido observadas en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, en modelos animales y en humanos. La desregulación neurovascular es un evento temprano en la enfermedad de Alzheimer, la más frecuente neuropatía central, asociado al envejecimiento, afectando la perfusión y conectividad del cerebro. Como consecuencia, las rutas intracelulares del oxígeno (metabolismo oxidativo), se ven comprometidas. En la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, la más frecuente neuropatía periférica hereditaria humana, el estudio del compromiso vascular ha sido escasamente señalado, a pesar de haber sido originalmente descrita como acompañada también de anomalías vasomotoras.

En la terapéutica preventiva/paliativa de las enfermedades neurodegenerativas, la restricción calórica (RC) en la dieta provee una aproximación no farmacológica que apunta a mejorar la habilidad de neuronas y glías, potenciando las vías autofágica-lisosomal, de chaperonas-UPS y restableciendo la proteostasis celular. La reducción de la disponibilidad energética produce reducción y resistencia al estrés oxidativo, lo que resulta también en un efecto vasoprotector. Contribuyen además a obtener dicho efecto la mejor biodisponibilidad de óxido nítrico, el incremento de expresión y actividad de enzimas antioxidantes (oxidasa de NADPH, superóxido dismutasa) y la activación de las vías que censan el nivel de nutrientes (SIRT-1 y mTOR). El efecto sobre el sistema vascular estaría mediado por neurotrofinas y VEGF quien posee efecto angiogénico en cerebro y corazón.

Estudios transcripcionales, permitieron, la construcción de un atlas topográfico de marcadores, caracterizando estructural y funcionalmente zonas vasculares específicas del cerebro de ratón. Sin embargo, mucha resta por elucidar en la comprensión profunda de la homeostasis neurovascular y en los mecanismos subyacentes que la desplazan, en condiciones neurodegenerativas y/o angiopáticas. La aproximación estructural-funcional que ofrece el Doppler Ultrarrápido, es una poderosa herramienta en el horizonte de estos desafíos, basado en la exploración vascular de modelos animales con neurodegeneración central y periférica y en su eventual remodelación, ante la RC.

3) Antecedentes del grupo

El tema central de investigación del Laboratorio de Acústica Ultrasonora (LAU) es el estudio de la propagación e interacción de ondas elásticas y acústicas lineales y no lineales con diferente tipo de materia sus posibles aplicaciones. El estudio de esta interacción onda elástica-materia y de sus propiedades físicas ha permitido generar diferentes aplicaciones en medicina clínica, biología y ciencia de materiales. El LAU intenta mantener equilibrio entre física aplicada y física de carácter más fundamental, las sinergias que nacen continuamente entre ellas lo permiten y enriquecen a ambas. A veces el trabajo se vuelca más a las aplicaciones de las herramientas físicas que poseemos y a veces buscamos nuevas respuestas en la física de la materia condensada y en la física ondulatoria.

El LAU ha trabajado en diferentes temas vinculados a la temática del proyecto: a) con el equipo Verasonics que permite

imagenología ultrarrápida se han estudiado las propiedades viscoelásticas de sólidos blandos (por ej. tejidos biológicos); b) focalización por inversión temporal en medios complejos multidifusores (como lo es por ejemplo el cráneo); c) imagenología de velocidad de partículas por ultrasonido (PIV) en arterias y símilas de arterias para estudio de flujos arteriales; d) técnicas de elastografía por interferometría de speckle, similar a la que se empleará para la superresolución (ver metodología). En este proyecto participaron el Dr. Tanter, Director de la Unidad "Physique pour la Medicine" de l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie-INSERM, que ha estado en la génesis del Doppler ultrarrápido, y miembros de su equipo. También participa el Dr. Calero del Instituto de Salud Carlos III-Madrid, especialista en estadística aplicada a la biología.

Estos antecedentes nos permitieron realizar las primeras experiencias en la región para obtener imágenes uDoppler de cortes coronales de cerebros de ratones con el equipo Verasonics128 que se adquirió en 2018. A partir de estos resultados y en el contexto descrito se realizó este proyecto con la finalidad de estudiar los componentes vasculares en el cerebro de enfermedades neurodegenerativas en modelos murinos

4) Descripción del proyecto

Este proyecto tenía como principal objetivo la implementación de herramientas ultrasónicas para la evaluación del flujo sanguíneo en un modelo murino para estudio de la componente vascular en enfermedades neurodegenerativas: el Doppler ultrarrápido (uDoppler) y la Microscopía de Localización Ultra-rápida Ultrasónica (uULM). Mediante μ Doppler se evalúan dos aspectos: a) los mapas de velocidad axial y de volumen de sangre en el cerebro (Cerebral Blood Volume-CBV) y b) la respuesta funcional (fUS) del animal a estímulos externos a través de cambios en el CBV. A partir de la técnica uULM se obtienen imágenes con mayor resolución de la red vascular y de la velocidad de flujo sanguíneo. Ambas herramientas se apoyan en el concepto de imagenología ultrarrápida: adquisición de un gran número de imágenes ultrasónicas a alta cadencia (hasta 20 kHz) para luego de filtrarlas, interpolarlas y combinarlas generar una única imagen de la magnitud física de interés a mayor resolución o más sensible que una única imagen ultrasónica.

En una primera etapa se puso a punto la técnica de uDoppler para ambos aspectos, mapas de CBV y respuestas funcionales en modelos murinos sanos, wild type, y modelos murinos con enfermedad neurodegenerativa tipo Trembler-J. Para esta etapa se analizaron los mecanismos físicos de la interacción onda ultrasonora-tejido: distribución espacio-temporal de la presión incidente, dispersión de ondas por el cráneo, absorción de ellas en función de la profundidad insonorizada. Se estudiaron los diferentes parámetros de la cadena emisión-propagación-detección de las señales retrodifundidas para formación de imágenes, como son la cadencia de imágenes, ángulos de emisión, filtros, interpolación e integración en el tiempo. Además se ajustó la excitación externa para identificar regiones de actividad hemodinámica específica en respuesta a estímulos externos.

Luego se trabajó para obtener unos de los objetivos específicos más importantes e innovadores de la propuesta: comparar imágenes de la vasculatura cerebral y mapas de CBV en modelos de ratones realizadas con uDoppler con las obtenidas con Microscopía Confocal de super-resolución. La Microscopía Confocal es una herramienta fundamental en la investigación biológica. Nuestro trabajo fue el primero en comparar y relacionar los resultados de obtenidos con ambas modalidades tan diferentes (en particular en las magnitudes que se miden y la resolución de cada una). En particular se pudo correlacionar las distintas magnitudes físicas que se miden en ambas tecnologías para establecer criterios comparativos. Por otro lado se estudió la respuesta funcional (fUS) del animal a excitaciones externas a través de cambios en el CBV en modelos murinos sanos y con enfermedades neurodegenerativas, analizando y comparando además la conectividad cerebral en estos modelos.

Se comenzó con experiencias con la técnica de uULM ajustando diferentes parámetros para obtener imágenes con superresolución como el control de densidad y tiempos de microburbujas que se inyectan y el análisis de diferentes tipos de filtros, interpolación e integración en el tiempo de imágenes. Esto permitió obtener imágenes del CBV con mejor resolución en vasos pequeños de la corteza y capilares en modelos murinos, que actualmente comenzamos a utilizar para complementar estudios hechos con uDoppler.

Metodología/diseño del estudio

a) Implementación, puesta a punto y optimización de las herramientas ultrasónicas para la evaluación del flujo sanguíneo en un modelo murino: el Doppler ultrarrápido (uDoppler) y la Microscopía de Localización Ultrarrápida Ultrasónica uULM.

a.1) Imagenología uDoppler y fUS con uDoppler

Para la generación de una imagen uDoppler se emiten ondas planas a diferentes ángulos y se reciben los ecos provenientes del tejido utilizando un transductor ultrasónico de 128 elementos a 15 MHz. Los ecos obtenidos para cada ángulo son combinados generando una imagen compuesta a una cadencia de 500 Hz. Una imagen uDoppler necesita al menos 200 imágenes compuestas (tiempo de adquisición 0.4s). A cada imagen compuesta se le aplica un filtro pasa-alto o descomposición en valores singulares para separar sangre de tejido. Finalmente, integrando en el tiempo (0.4s) la señal

obtenida en cada posición e interpolando se obtiene una imagen de Doppler de potencia de alta sensibilidad. Se utiliza el ecógrafo ultrarrápido Verasonics .

Los resultados obtenidos para los mapas e imágenes del volumen de sangre cerebral (CBV) e identificar regiones de actividad hemodinámica específica en respuesta a estímulos externos en modelos murinos wild type y con enfermedad neurodegenerativa Trembler -J son comparados y se busca una correlación con los obtenidos con Microscopía Confocal de superresolución..

Se diseñó un protocolo de posicionamiento de la sonda para saber exactamente la zona del cerebro insonorizada a partir del mapa del cerebro que figura en el atlas . Se analizan y optimizan los mecanismos físicos de interacción –ultrasonido-tejido: distribución espacio-temporal de la presión incidente, dispersión de ondas por el cráneo, absorción; y parámetros de la cadena emisión-propagación-detección de las señales para formación de imágenes: cadencia de imágenes, ángulos de emisión, filtros, interpolación e integración en el tiempo. Para las experiencias funcionales con uDoppler (fUS) para evaluar la respuesta a estímulos externos de los modelos murinos se realizaron la adquisición de sucesivas imágenes uDoppler a alta cadencia. Así se correlacionan los cambios medidos en el CBV mediante el modo fUS de uDoppler con un patrón de estímulo de terminado y periódico (por ejemplo excitar los bigotes). Se ajusta la resolución espacio-temporal, los filtros y la interpolación para cada estímulo utilizado. Se utilizan algoritmos de correlación entre estímulo y señal de CBV para obtener la mayor cantidad de información.

a.2) Imagenología uULM

Para implementar el uULM se utiliza ecógrafo ultrarrápido Verasonics. La secuencia ultrasónica es similar a la del uDoppler.La gran diferencia entre el uDoppler y el uULM consiste en la inyección de microburbujas de gas en los vasos, siendo las responsables de la superresolución. La tasa de inyección, concentración y tamaño de las microburbujas se ajustan para el modelo murino analizado. Una vez inyectadas las microburbujas y realizada la adquisición ultrasónica se procede al tratamiento de los datos para obtener las imágenes. Se aplican correcciones de movimiento y filtrado espacio-temporal para remover señales provenientes del tejido, se individualiza cada microburbuja localizando su centroide .Es en este punto donde entra en juego la superresolución ya que el centroide de cada burbuja se detecta con una resolución cuyo límite inferior está dado por el teorema de Cramer-Rao. Detectado el centroide, se calcula la trayectoria de cada burbuja a lo largo de las diferentes imágenes. Esto permite obtener imágenes de densidad de burbujas o calcular su velocidad. Finalmente se suman todas las imágenes generando una única imagen de superresolución con alta sensibilidad para detectar velocidades en micro vasos menores a 1mm/s y obtener imágenes de micro vasos de diámetro menor a 10 micras y se discrimina flujo arterial y venoso. Las imágenes obtenidas son para detectar diferencias en el sistema vascular de ratones wild type y

Trembler-J. Este último paso necesita gran poder de cálculo, el volumen de datos manejado es muy alto.

b) La metodología biológica a aplicar se describe en los siguientes ítems:

Los modelos animales: Trembler-J es un modelo de CMT1E, portadores de la mutación L16P en pmp22, presente desde el inicio de la vida en los ratones viables (TrJ/+). En estos mutantes, el sistema nervioso nunca adquiere las características fenotípicas de los ratones de genotipo salvaje (+/+). Los ratones SAMP8 presentan senescencia neurológica acelerada, por lo que es utilizado para modelizar la EA-espóradica. La estrategia del proyecto en el manejo animal es someter a una población de ratones de TrJ, SAMP8 y sus controles a dos dietas alimenticias con niveles energéticos diferentes (RC y alimentación Ad Libitum, AD) para estudiar luego los siguientes aspectos de las respuestas murinas en ambas condiciones energéticas:

- 1.- Caracterización de la red arterial y venosa en el SNC y en el SNP, mediante marcadores específicos, Microscopía Confocal de superresolución, imágenes en mosaico de secciones coronales de 50µm de espesor, seriadas, de los mismos cerebros analizados por uDoppler y uULM.
- 2.- la expresión génica a nivel del transcriptoma por secuenciación masiva (sólo en TrJ);
- 3.-la expresión proteica de genes candidatos, cuyos transcritos muestren alteraciones de su expresión, en SNC y SNP, mediante estudios bioquímicos e histológicos, in situ, por Microscopía Confocal cuantitativa y FRET;
- 4.- Evaluación de la actividad mitocondrial mediante medida del consumo de oxígeno tisular, en el SNP y en el SNC.
- 5.- Estudios metabólicos en sangre (glicemia,lactato, proteínas totales, albúmina, globulinas, betahidroxibutirato, ácidos grasos no esterificados, urea, colesterol), en ratones sometidos a RC y AL.
- 6.- Tests de comportamiento. Para evaluar las implicancias de los tratamientos y del grupo en el comportamiento a nivel del sistema nervioso central se realizarán dos tests de ansiedad: el test de campo abierto (Open Field Test) y el laberinto elevado en cruz (Elevated Plus Maze).
- 7.- Test neuromotores, para evaluar la respuesta a los tratamientos de disponibilidad energética se realizarán los test de la Barra Fija y de Rotarod.

Resultados, análisis y discusión

--Implementación nuevas tecnologías ultrasónicas

Existen comportamientos hemodinámicos específicos del cerebro que son considerados indicadores de diagnóstico y ayudan a la comprensión de afecciones neurodegenerativas. La respuesta hemodinámica se manifiesta principalmente en pequeños vasos, no pudiendo ser evaluada con herramientas estándar. Por ello el principal resultado de este proyecto fue poner a punto, implementar y optimizar dos novísimas herramientas ultrasónicas que permiten evaluar el flujo sanguíneo cerebral con mucha mayor resolución que el Doppler convencional: Doppler ultrarrápido (uDoppler) y Microscopía de Localización Ultrarrápida Ultrasónica (uULM). Para ello se analizaron los mecanismos físicos de la interacción onda ultrasonora-tejido optimizando los diferentes parámetros de la cadena emisión-propagación-detección de las señales retrodifundidas para formación de imágenes. Además la imagenología in vivo obtenida con uDoppler fue combinada con imagenología por microscopía confocal obtenida post mortem y la segmentación de ambas se constituyó en una valiosa herramienta de cuantificación para el análisis del componente vascular.

1- La implementación de la técnica de uDoppler permitió obtener imágenes de velocidad axial y volumen de sangre con mucha mayor sensibilidad y resolución en comparación al Doppler convencional, esto permitió :

-- realizar estudios de las variaciones del flujo sanguíneo cerebral en el envejecimiento normal en modelos murinos

-- la caracterización hemodinámica cerebro-vascular como un componente del fenotipo neurodegenerativo en el modelo animal Trembler-J.

-- mediante la adquisición de sucesivas imágenes uDoppler fue posible evaluar la respuesta funcional (fUS) del animal a estímulos externos en la corteza somatosensorial y la conectividad entre diferentes zonas del cerebro en condiciones basales y durante la respuesta al estímulo en modelos murinos en condiciones normales y de neurodegeneración

-- fue posible determinar la modulación de la dinámica cerebro-vascular por compuestos antioxidantes en modelos murinos en condiciones normales y de neurodegeneración

2- Se implementó la técnica de Microscopía de Localización Ultrasónica (uULM), mediante la inyección de microburbujas lo que permite una importante ganancia en la resolución gracias a la reflectividad de las microburbujas y el software de seguimiento de las mismas implementado. Así se generaron imágenes con superresolución que actualmente se utilizan para los estudios realizados por uDoppler y fUS por uDoppler citados.

--Caracterización del componente vascular en el envejecimiento y la neurodegeneración. Análisis del fenotipo neurodegenerativo Trembler-J, modelo murino de la afección Charcot-Marie-Tooth 1E.

La hemodinámica cerebrovascular juega un rol central en la fisiología, el metabolismo y el drenaje de residuos a nivel del cerebro. Existe una clara relación entre la neurovasculatura cerebral y la salud del cerebro, siendo la disfunción cerebrovascular, un fenómeno causa/efecto asociado al envejecimiento y/o a las enfermedades neurodegenerativas. Los altos requerimientos de oxígeno y nutrientes demandados por el cerebro así como la necesidad de evacuación de sus residuos, ponen al flujo sanguíneo y a la estructura cerebrovascular toda, en el centro del análisis y comprensión de la fisiología normal o patológica del cerebro. Con estas ideas en mente, el inicio del proyecto que hoy finaliza centró sus esfuerzos en la puesta a punto de la imagenología uDoppler in vivo para caracterizar el flujo sanguíneo cerebral en ratones de genotipo salvaje (wt) de 5 y 21 meses de edad y la combinamos con la imagenología obtenida por microscopía confocal, de secciones de las mismas regiones del cerebro, para caracterizar la volumetría vascular. De esta manera, construimos una herramienta apropiada para analizar la fisiología y la estructura vascular. Pusimos a punto una segmentación en cuartiles de los datos que nos permitió cuantificar el abordaje, incorporando así un elemento de análisis adicional. Agregamos al proyecto original, este imprescindible objetivo que nos permitió reconocer la modulación funcional y estructural de la dinámica cerebrovascular, debida al envejecimiento, demostrando así la sensibilidad y precisión de los abordajes puestos a punto. Los resultados indicaron, por primera vez, que el envejecimiento en los ratones se acompaña de reducción en el volumen y en el flujo sanguíneo (Anzibar, M; Vázquez, L.; Martínez, M.; et al, 2022, Scientific Reports, Nature).

Las neuropatía hereditaria periférica humana más frecuente es la afección de Charcot-Marie-Tooth, (CMT), con una prevalencia variable a nivel mundial (de aproximadamente 1:1250 en los países nórdicos a 1:9000 en Japón), su principal manifestación clínica es un progresivo déficit sensorial y motor, de gravedad variable según el tipo de alteración genética. Más de 1000 mutaciones en 80 diferentes genes de las células del Sistema Nervioso Periférico (neuronas y células de Schwann), están en el origen de estas afecciones. Mutaciones que afectan el gen pmp22 que codifica para la proteína Peripheral Myelin Protein-22 (PMP22), causan alrededor del 50% de todas las CMTs. CMT1E es un subtipo portador de micromutaciones en pmp22, modelizado con alta fidelidad biológica en los ratones Trembler-J, portadores de la misma

mutación espontánea en *pmp22* que la descrita en pacientes humanos, portadores de un tipo de CMT1E. En el marco del presente proyecto, hemos contribuido a la comprensión de los roles de la proteína, caracterizando su expresión en núcleos de células de Schwann, en nervios ciáticos intactos de ratones wt y TrJ, demostrando que la proteína se encuentra asociada a dominios transcripcionalmente activos y determinado que los niveles presentes en el ratón mutante son significativamente mayores a los observados en los ratones de genotipo salvaje (Di Tomaso et al., 2022). Así, un posible rol modulador o regulador de la expresión génica podría sumarse al inicialmente señalado como gen de expresión durante el detenimiento celular (*GAS-3* gene, Manfioletti et al, 1990). PMP22 se expresa principalmente pero no exclusivamente en las células de Schwann, como también lo hemos demostrado en el transcurso de este proyecto. Nuestros resultados publicados recientemente (Damián et al., 2021), indican que tanto el gen *pmp22* como su proteína PMP22, se expresan en las neuronas del cerebro, en ratones de genotipo salvaje y Trembler-J, pero la expresión de la proteína es mayor en TrJ. El manejo del modelo animal, nos permitió también observar, su comportamiento y describir con precisión, asociado a esta diferencia hipocampal, la existencia de niveles de ansiedad significativamente superiores a los normales en los ratones TrJ. A pesar de que las CMTs fueron inicialmente descritas por Charcot y Marie en 1886 como una afección del Sistema Nervioso Periférico con alteraciones vasomotoras, el estudio del componente vascular en las CMTs, ha sido escasamente explorado. A la luz de nuestros resultados previos (Damián et al., 2021), decidimos analizar la dinámica cerebrovascular de la región hipocampal in vivo mediante uDoppler y la combinamos con la caracterización de la volumetría vascular post mortem, mediante microscopía confocal. Los resultados obtenidos indicaron el compromiso cerebrovascular en el fenotipo neurodegenerativo TrJ. Así, hemos sometido recientemente a revisión por pares, un trabajo en el que señalamos mayores flujos sanguíneos asociados a mayores volúmenes vasculares en el hipocampo TrJ, significativamente diferentes a los observados en las mismas regiones del cerebro wt y verificado que el comportamiento ansioso está incrementado en TrJ y presente a edades más tempranas que las señaladas en nuestro artículo de 2021, demostrando que la ansiedad es un componente fenotípico que caracteriza la afección (Martínez et al., 2023, Biology, sometido el 13 de julio de 2023, trabajo de Doctorado en curso de Mariana Martínez). En el análisis del fenotipo neurodegenerativo modelizado en los ratones Trembler-J, también hemos explorado la respuesta cerebrovascular a estímulos externos de las vibrisas murinas. Los ratones TrJ muestran una disminuída respuesta del flujo sanguíneo en la corteza somatosensorial contralateral al estímulo y niveles de conectividad sensiblemente mayores y diferentes a los observados en los ratones de genotipo salvaje antes y durante el estímulo. Estos resultados forman parte de un manuscrito en redacción para ser enviado a su publicación en Scientific Reports a principios del mes de agosto (Anzibar et al, 2023 y Tesis de Maestría de Maximiliano Anzibar, defendida 6 de julio 2023). Como parte del proyecto, también hemos analizado la modulación del componente cerebrovascular in vivo y su estructura y los cambios comportamentales, en respuesta a la acción hormética de la curcumina, suministrada a dosis bajas durante tiempos prolongados, en ratones de genotipos TrJ y wt. (manuscrito en preparación). Es importante señalar que la vehiculización de la curcumina (polifenol natural, altamente hidrofóbico) utilizado como agente anti oxidante, ha supuesto un desafío que hemos explorado también in vitro, demostrando que la acción de los vehículos convencionales utilizados para su solubilización (alcohol o DMSO), son altamente tóxicos para células de Schwann wt o TrJ, pero los efectos de ellos son irreversibles en el genotipo mutante (Vázquez et al., 2022). En continuidad con estos abordajes, hemos puesto a punto la utilización y caracterización de nanopartículas de Poli-Dopamina, en niveles de inocuidad, que aseguran su utilización en tratamientos y modelos in vitro e in vivo, lo que constituye, desde una perspectiva básica y terapéutica, una valiosa herramienta para la utilización de la curcumina y de otros agentes anti-oxidantes, (Vázquez et al., 2023, sometido a Chemical Engineering Journal 20 de julio 2023). Debido a los problemas generados como consecuencia del confinamiento durante la pandemia y a dificultades biosanitarias surgidas en el Animalario del Instituto de Salud Carlos III de España, las cepas SAMP8 y sus controles murinos (SAMR1), no pudieron ser enviadas al Uruguay hasta el presente mes de julio, en el que se concretará su llegada. Lamentamos esta situación que nos impidió cumplir con uno de los objetivos de este proyecto en el tiempo de su ejecución. Sin embargo, entendemos que el bagaje de experiencia que hemos adquirido con el modelo TrJ, nos permitirá procesar rápidamente los mismos abordajes en SAMP8, modelo murino de la Enfermedad de Alzheimer esporádico.

--Resultados en imagenología por uULM

Se implementó la técnica uULM optimizando los diferentes parámetros que intervienen: densidad de burbujas, tiempo de inyección, algoritmo de seguimiento del centroide de cada burbuja. Se obtuvo la necesaria resolución para obtener buenas imágenes de microvasos (10 -15 micras aprox.) como arteriolas, capilares , vasos de la corteza y se pudo además discriminar la direccionalidad del flujo. Estos resultados permiten realizar estudios en regiones del cerebro que contengan fundamentalmente microvasos , y son un muy buen complemento de los diferentes estudios ya citados y realizados por uDoppler y fUS Doppler. Actualmente el grupo trabaja en esta dirección.

Conclusiones y recomendaciones

Además de los resultados específicos y conclusiones detalladas en el ítem anterior, podemos mencionar como conclusión importantes de este proyecto el hecho de que fue verdaderamente interdisciplinario entre Física y Biología-Neurociencia, con participación e interacción de investigadores y estudiantes de ambas disciplinas. La sinergia generada entre la física y la biología-neurociencia en este proyecto ha permitido pensar en abordar nuevos temas y desafíos tanto básicos como tecnológicos, en particular en el área de análisis armónico (tratamiento de señales), microfluídica, implantación de sondas ultrasónicas para uDoppler y fUS uDoppler para análisis de actividad cerebro-vascular relacionada a la memoria y aprendizaje in vivo y en vigilia en diferentes modelos murinos.

Por otro lado es de hacer notar que las tecnologías ultrasónicas implementadas y su utilización para evaluar flujo sanguíneo cerebral en pequeños animales son únicas en la región de América Latina y el Caribe, teniéndose además ya diferentes solicitudes del país (F.Medicina, IIBCE, F.Veterinaria entre otras) y de la región (Chile, Brasil, México) para realizar este tipo de estudios que permiten estas nuevas tecnologías puestas a punto.

A pesar de las dificultades generadas por la pandemia entendemos que este fue un período sumamente fructífero en la consolidación de hallazgos, vínculos académicos y perspectivas de futuro. Esto fue posible a la creación de un equipo humano con un alto compromiso y comprensión de los desafíos a enfrentar.

Referencias bibliográficas

Una selección de referencias generales y del equipo de trabajo relacionadas con el proyecto.

1-Functional ultrasound imaging of the brain

E.Macé,G.Montaldo,I.Cohen,M.Baulac,M.Fink &M.Tanter,Nature methods pp.664-666,Vol.8 no.8,2011

2 - Functional Ultrasound Imaging of the Brain:Theory and Basic Principles

E.Mace,G.Montaldo,B.F.Osmanski,I.Cohen,M.Fink&M.Tanter

IEEE Transactions on UFFC,vol. 60,no.3,pp.492-506,2013

3-Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging

C.Errico,J.Pierre,S.Pezet,Y.Desailly,Z.Lenkei,O.Couture &M.Tanter,Nature, vol 527,pp.499-502,2015

4-Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy

5-Method of the Year 2008, Nature Methods 6 (1):1-109,2009

6-Ultrasound shock wave generator with one-bit time reversal in a dispersive medium, application to lithotripsy.

Montaldo,G.,P. Roux,A. Derode,C. Negreira,&M. Fink.

Applied Physics Letters 80,no.5 pp:897-899,2002

7-Generación de Pulsos Ultrasónicos de Potencia con Guías de Ondas Dispersivas.

Tesis Doctorado PEDECIBA-Física G.Montaldo, dirección C.Negreira

8-A diffraction correction for storage and loss moduli imaging using radiation force based elastography

E.Budelli,J.Brum,M.Bernal,C.Negreira&J.L.Gennisson

Physics in Medicine and Biology, v:62 1,p:91 - 106,2017

9-Application of 1-D Transient Elastography for the Shear Modulus Assessment of Thin-Layered Soft Tissue: Comparison With Supersonic Shear Imaging Technique

J.Brum, J.L.Gennisson,T.Nguyen,M.Tanter,M.Fink, N.Benech, C. Negreira

IEEE Transactions on UFFC,v.:59 4,p:703 - 714,2012

10-Elastography and time reversal of shear waves: application to the elasticity imaging of soft solids.

Tesis Doctorado PEDECIBA-Física J.Brum, dirección C.Negreira,2012

11-Ultrafast Ultrasound Doppler vs. confocal microscopy in a mouse brain model

J.Brum,M.Martinez,J.Baranger, J.Fidalgo, M.Calero, M.Tanter,C.Negreira, A.Kun

International Congress on Ultrasonics, Bruges-Belgique, set 2019

11a-Kisler K, et al 2017 Nat Rev Neurosci.2017;18(7):419-434. doi: 10.1038/nrn.2017.48.

12-Hall CN et al.2014 Nature 508, 55-60,doi: 10.1038/nature13165

13-Weissman M.et al.2018 J Neurochem.;144(5):549-564 doi:10.1111/jnc.14213.

14-Iturria-Medina et al 2016 Nature Communications 7:11934 doi:10.1038/ncomms11934 15-Tegeder I 2019 Cell Signaling.doi:https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.10.019

16-Marzetti 2013 Am J Physiol Heart Circ Physiol 305; doi:10.1152/ajpheart.00936.2012.

17-Höhna A. 2017 Redox Biology 11,482-501 dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.001

18-Brooks A. 1980, Neurosurgery, and Psychiatry,1980,43,348-350

19-Charcot, J-M,et Marie,P.1886 Rev Med; 6:97-138.

20-Mattson MP & Wan R. 2005. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems.J Nutr Biochem 16:129-137.muel T et al.2006 ; 91(11):4258-4272

21-Donato AJ, et al. 2013. Life-long caloric restriction reduces oxidative stress and preserves nitric oxide bioavailability and function in arteries of old mice Aging Cell 12:772-783.

22-Sun Y, et al. 2003. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. J Clin Invest 111:1843-1851.

23-Lynch CD, et al. 1999. Effects of moderate caloric restriction on cortical microvascular density and local cerebral blood flow in aged rats Neurobiol Aging 20: 191-200

24-Vanlandewijck M. et al. 2018 Nature, doi:10.1038/nature25739

25-Sweeney M. 2018 Nat Neurosci ;21(10):1318-1331 doi:10.1038/s41593-018-0234-x.

26-Characterization of amyloid b plaques and autofluorescent lipofuscin aggregates in Alzheimer´s disease brain: a confocal microscopy approach.

Alejandra Kun, Fernando González-Camacho, Silvia Hernández, Alexandra Moreno-García, Olga Calero, and Miguel Calero. 2017. Methods Molecular Biology,Vol. 1779, Einar M. Sigurdsson et al. (Eds): Amyloid Proteins, 978-1-4939-7815-1, 429780_3

- 27-An overview of the role of lipofuscin in age-related neurodegeneration.
Moreno-García A, Kun A, Calero O, Calero M, Medina M. 2018 *Frontiers in Neuroscience*,
<http://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00464/full>
- 28-The spatial focusing of a leaky time reversal chaotic cavity
G. Montaldo, N. Perez, M. Fink, C. Negreira
Waves in random and complex media, v:17 1, p.:67-83, 2007
- 29-Application of the Schlieren pulsed method for the observation of simple and multiple scattering of ultrasonic waves.
I. Nuñez, A. Arzúa, G. Cortela, C. Negreira
IEEE Transactions on UFFC, v.: 52 3 , p.:491- 494, 2005
- 30-Generation of ultrasonic finite amplitude waves through multiple scattering medium by time reversal in a waveguide
G. Garay, Y. Abraham, N. Benech, C. Negreira
Proceedings of the Meeting of the Acoustical Society of America Vol.141 5, pp:374.375, 2015
- 31-Improvement of the time-reversal focalization through a multiple scattering medium by using a coherent wave compounding technique
Y. Abraham, D. Carrasco, C. Negreira, N. Benech
Proceedings IEEE Ultrasonic Symposium 2014
- 32-Vortex dynamics in compliant stenotic aortic models using ultrasonic particle imaging velocimetry
J. Brum, M. Bernal, N. Barrere, A. l'Her, C. Cabeza, C. Negreira
Internacional Congress on Ultrasonics, set. 2019, Bruges-Bélgica
- 33-Monitoring heat-induced changes in soft tissues with 1D transient elastography
N. Benech, C. Negreira
Physics in Medicine and Biology, v:55 p.:1753-1765, 2010
- 34-Poly(ADP-ribosylation) is present in murine sciatic nerve fibers and is altered in a Charcot-Marie-Tooth-1E neurodegenerative model.
Lafón L., Romeo C, Cal K, Viches S, Sotelo JR, Folle G, Fernández S, Kun A.
2017 *PeerJ*. 2017 May 10;5:e3318. doi: 10.7717/peerj.3318. eCollection 2017.
- 35-Glia to axon RNA transfer.
Sotelo JR; Canclini L; Kun A.; Sotelo-Silveira JR; Calliari A; Bresque M; Di Paolo A; Farías J; Mercer JA.
2014, *Developmental Neurobiology (E)*, v:74 3, p:292-302
- 36-Association of Myosin Va and Schwann cells-derived RNA in mammal myelinated axons, analyzed by immunocytochemistry and confocal FRET microscopy.
Canclini L, Wallrabe H, Di Paolo A, Kun A, Calliari A, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR.
2013. *Methods*. doi:pii: S1046-2023(13)00208-9. 10.1016/j.ymeth.2013.06.007.
- 37-Myosin-Va-dependent cell-to-cell transfer of RNA from schwann cells to axons.
Sotelo JR, Canclini L, Kun A, Sotelo-Silveira JR, Xu L, Wallrabe H, Calliari A, Rosso G, Cal K, Mercer JA.
2013 *PLoS One*. 23;8(4):e61905. doi:10.1371.
- 38-Unravelling crucial biomechanical resilience of myelinated peripheral nerve fibers provided by the Schwann cell basal lamina and PMP22.
Rosso G.; Liashkovich I; Gess B; Youn G P; Kun A.; Shahin V.
2014. *Nature Scientific Reports*, DOI: SREP-14-06367A
- 39-Myelinating and demyelinating phenotype of Trembler-J mouse (a model of Charcot-Marie-Tooth human disease) analyzed by atomic force microscopy and confocal microscopy.
Rosso G, Negreira C, Sotelo JR, Kun A. 2012.
J. Mol Recognit. 25(5):247-55. doi: 10.1002/jmr.2176. PMID:22528185
- 40-The Schwann Cell-Axon Link in Normal Condition or Neuro-Degenerative Diseases: An Immunocytochemical Approach.
Alejandra Kun, Gonzalo Rosso, et al.
2012. Capitulo 12 del libro: *Applications of Immunocytochemistry*, pag: 249-266, Editor: Hesam Dehghani; Subject: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, Publisher: InTech, ISBN: 978-953-51-0229-8.
- 41-F-actin distribution at nodes of Ranvier and Schmidt-Lanterman incisures in mammalian sciatic nerves.
Kun A, Canclini L, Rosso G, Bresque M, Romeo C, Hanusz A, Cal K, Calliari A, Sotelo Silveira J, Sotelo JR.
2012 *Cytoskeleton (Hoboken)* doi:10.1002/cm.21011. PMID: 22328339
- 42-Expresión y organización de la actina y su modulación por AMPc en nervios periféricos de un modelo animal de Charcot-Marie-Tooth 1E-

2017, Tesis de Maestría Karina Cal, Tutores: Alejandra Kun-Aldo Calliari.

43-Análisis microscópico de las diferencias entre las fibras nerviosas periféricas de ratones wt y Trembler J portadores de Charcot-Marie-Tooth tipo 1E en condiciones ad libitum y bajo un tratamiento de restricción calórica.

2014 Tesis de Maestría, Tutores: Alejandra Kun-Miguel Calero. PEDECIBA.

44a-Handbook of Animal Models in Alzheimer's Disease.

Series Advances in Alzheimer's Disease Volume 1, 2011, Editors Gemma Casadesus, ISBN 978-1-60750-732-1 | 978-1-60750-733-8

44-Adaptive spatiotemporal SVD clutter filtering for ultrafast Doppler imaging using similarity of spatial singular vectors.

BARANGER, Jérôme, et al.

IEEE Transactions on medical imaging, 2018, vol.37, no7, p:1574-1586.

45-Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: A magnetic resonance imaging and micro computed tomography study

A. Dorr et al, Neuroimage, vol.35, pp.1409-1423, 2007.

46-Evaluation of cerebral blood flow changes in focal cerebral ischemia rats by using transcranial Doppler ultrasonography

L. Li et al, Ultrasound Med. Biol., vol.36, p:595-603, 2010.

47-Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain

A.Y. Shih et al, J. Cereb. Blood Flow Metab., vol.32, pp:1277-1309, 2012.

48-Penetrating arterioles are a bottleneck in the perfusion of neocortex

N. Nishimura et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.104, pp:365-370, 2, 2007.

49-Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli

E. Chaigneau and S. Charpak, et al.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.100, pp:13081-13086, Oct. 28, 2003.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)